



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PRENSAGEM DO MOSTO
E DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM VINHOS BRANCOS.
SÍNTESE, IDENTIFICAÇÃO, ELUCIDAÇÃO DE ESTRUTURA
DE ADUTOS FORMADOS EM REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DE
VINHOS BRANCOS**

DOUTORADO

Nayla Elaine Ferreira Lima

**Florianópolis
2016**

Nayla Elaine Ferreira Lima

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PRENSAGEM
DO MOSTO E DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM
VINHOS BRANCOS. SÍNTESE, IDENTIFICAÇÃO,
ELUCIDAÇÃO DE ESTRUTURA DE ADUTOS
FORMADOS EM REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DE
VINHOS BRANCOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos da
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau de doutor em Ciência
dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marilde T. Bordinon Luiz.

**Florianópolis
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Nayla Elaine Ferreira

Influência das condições de prensagem do mosto e da
adição de glutathione em vinhos brancos. : Síntese,
identificação, elucidação de estruturas de adutos formados
em reações de oxidação de vinhos brancos / Nayla Elaine
Ferreira Lima ; orientadora, Marilde T. Bordignon Luiz -
Florianópolis, SC, 2016.

126 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, . Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Prensagem. 3. Glutathione.
4. Oxidação de vinhos brancos. 5. Adutos de oxidação. I.
Luiz, Marilde T. Bordignon. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PENSAGEM DO
MOSTO E DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM VINHOS
BRANCOS. SÍNTESE, IDENTIFICAÇÃO, ELUCIDAÇÃO DE
ESTRUTURA DE ADUTOS FORMADOS EM REAÇÕES DE
OXIDAÇÃO DE VINHOS BRANCOS**

Por

Nayla Elaine Ferreira Lima


Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

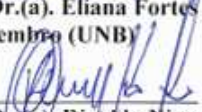
Florianópolis, 02 de junho de 2016

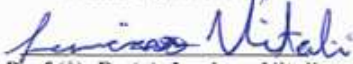
Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof.(a). Dr.(a). Marilde Terezinha Bordignon Luiz,
Orientador (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Eliana Fortes Gris,
Membro (UNB)


Prof.(a). Dr.(a). Rivaldo Niero,
Membro (UNIVALI)


Prof.(a). Dr.(a). Luciano Vitali,
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina Maisonnave Arisi,
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Carlise Beddin Fritzen Freire,
Membro (UFSC)

*Dedico aos meus pais, Nelson e
Marlene, que sempre me apoiaram
com muito amor, carinho e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre está presente em todos os momentos de minha vida.

À minha família, meus pais Nelson e Marlene e meu irmão Eduardo, pelo amor, apoio, força e acima de tudo pelo incentivo a alcançar meus objetivos. Muito obrigada, essa conquista também é de vocês!

À minha orientadora Dra. Marilde T. Bordignon Luiz, obrigada pela confiança e pelo aprendizado durante todos esses anos. Obrigada por me apresentar a pesquisa científica e também a dedicação pela docência.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, o *lab*, Vívian, Carol, Trilícia, Saionara, Isabel, Isabela, Stephanie e Robson e à todos que já passaram durante esses anos. Obrigada pela ajuda, pelo apoio e também pelas risadas durante o café e momentos de confraternização compartilhados.

Aos meus amigos, em especial Sinara, Júnior, Talita, Roberta, Vívian e Tanes, obrigada por fazerem parte tão importante da minha vida, pela amizade e parceria em todos os momentos. “A gente não faz amigos, reconhece-os”.

À minha grande amiga Vívian, por ser muito mais que uma “colega” de laboratório e por estar sempre ao meu lado durante a realização deste trabalho, até mesmo por *Skype* quando a distância não nos permitia conversar pessoalmente. Muito obrigada pelo suporte, pela parceria e pelo incentivo em todos os momentos.

À Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina – Epagri, Estação Experimental de Videira, em especial Vinícius Caliar, pelo suporte técnico e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Véronique Cheynier, por ter me recebido na Plataforma de Polifenóis, no Departamento de *Sciences Pour L’oenologie* no *Institut National de la Recherche Agronomique* – INRA em Montpellier, França, pela confiança depositada para a realização de parte deste trabalho e por todos os valiosos ensinamentos ao longo do estágio de doutoramento.

À todos da Plataforma de Polifenóis do INRA, Emmanuelle, Nicolas, Jean Paul, Christine, Pascale, Thierry, Rafael e Anna, pelos ensinamentos de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, pelo apoio na realização das análises e momentos de descontração, e também pelo esforço em me ensinar a língua francesa, *Merci!*

À minha *família francesa*, Pascale e Claire, obrigada por terem me acolhido como filha e irmã, pelo carinho e amizade, que fizeram com que eu me sentisse acolhida e segura mesmo tão longe de casa. Muito obrigada pelas lições de rugby e de francês que jamais serão esquecidas!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pelo apoio, disponibilidade e ensinamentos prestados ao longo dos anos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A mente que se abre a uma nova
ideia nunca mais volta ao seu
tamanho original.
(Albert Einstein)

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da pressão durante a etapa de prensagem do mosto e adição de glutathione na composição química de vinhos brancos e avaliar as principais características durante o armazenamento em garrafa. Sintetizar, identificar e elucidar a estrutura de compostos originados em reações de oxidação envolvendo ácidos hidroxicinâmicos e glutathione ou cisteinil-glicina, bem como desenvolver um método para quantificação simultânea desses compostos e seus precursores em vinhos elaborados com diferentes tratamentos de proteção da oxidação. Para avaliação do efeito de da prensagem do mosto e adição de glutathione em vinhos foram utilizadas as variedades Chardonnay, Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega (*V. vinifera*) cultivadas em Videira, no Estado de Santa Catarina, Brasil. Diferentes frações do mosto foram obtidas em processo contínuo: sem aplicação de pressão (FR – *free run juice*); pressão de 0,5 - 1,0 bar (prensagem intermediária) e aplicação de pressão de 1,0 - 2,0 bar (prensagem alta). A glutathione reduzida (GSH) foi adicionada aos vinhos antes do engarrafamento em concentração de 10 mgL⁻¹. Foram avaliados os parâmetros enológicos clássicos, polifenóis totais, *o*-difenóis, flavanóis totais, atividade antioxidante *in vitro* e índice de escurecimento por espectrofotometria e compostos fenólicos individuais e concentração de glutathione total, reduzida e oxidada por cromatografia líquida de alta eficiência. Para síntese dos produtos de oxidação foi utilizado um sistema de solução modelo contendo ácido caftarico ou cafeico, glutathione ou cisteinil-glicina e extrato de enzima polifenol oxidase (PPO). Os produtos das reações foram primeiramente identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas (UPLC-MS) e os principais compostos sintetizados foram estruturalmente elucidados por ressonância magnética nuclear (RMN). Para a validação e aplicação do método, foram utilizados vinhos brancos da variedade Chardonnay, o método de monitoramento de múltiplas reações (UPLC-MS-MS) foi validado e aplicado para a quantificação de produtos de oxidação e seus precursores em vinhos brancos com diferentes tratamentos de proteção da oxidação. Resultados obtidos neste estudo mostraram que as condições de prensagem dos mostos afetaram a composição química dos vinhos com os quais foram produzidos, levando à maior extração de compostos fenólicos, principalmente ácido caftarico, bem como maior concentração de glutathione. A adição de glutathione em vinhos antes do engarrafamento mostrou-se efetiva na proteção dos principais compostos de vinhos brancos (especialmente ácidos

hidroxicinâmicos), prevenindo o escurecimento. Nas reações de síntese dos produtos de oxidação entre ácidos hidroxicinâmicos e glutathiona ou cisteína-glicina, o *2-S-glutathionyl trans-caftaric acid*, *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid* e *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* foram os principais produtos obtidos, porém espécies minoritárias foram estruturalmente elucidadas por experimentos de RMN: *2,5-di-S-glutathionyl trans-caftaric acid*; *2-S-glutathionyl cis-caftaric acid*; *5-S-glutathionyl trans-caftaric acid*; *2,5-di-S-glutathionyl trans-caffeic acid*; *5-S-glutathionyl trans-caffeic acid*; *2-S-glutathionyl cis-caffeic acid*; *6-S-glutathionyl trans-caffeic acid*; *2-S-cysteinylglycyl cis-caftaric* e *5-S-cysteinylglycyl trans-caftaric*. O método de UPLC-MS-MS para a quantificação dos principais produtos de oxidação, ácidos hidroxicinâmicos e glutathiona reduzida e oxidada foi desenvolvido e validado, em 26 minutos de corrida cromatográfica foi possível quantificar 13 compostos em vinhos brancos: *2-S-glutathionyl trans-caftaric acid*, *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid* e *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid*, ácidos caftárico (*cis* e *trans*), cafeico, cumárico, cutárico, cumárico glicosídeo (1 e 2), ferúlico glicosídeo, glutathiona reduzida e glutathiona oxidada. Entre os diferentes tratamentos de proteção de vinhos brancos avaliados, a adição de SO₂ no momento da colheita e na prensa pneumática se mostrou o mais efetivo.

Palavras-chave: Prensagem. Glutathiona. Oxidação de Vinhos Brancos. Adutos de Oxidação.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of pression during the must pressing step in the white winemaking and the addition of glutathione to white wines and evaluate the main characteristics during bottle ageing. Synthesize, identify and elucidate the chemical structures of compounds originated in the oxidation reactions between hydroxycinnamic acids and glutathione or cysteinyl-glycine, as well to develop an analytical method to quantify these compounds and their precursors, simultaneously, in wines with different treatments against oxidation. To evaluate the effect of different pressings and glutathione addition in musts and wines, Chardonnay, Sauvignon blanc, Manzoni and Garganega varieties (*V. vinifera*) cultivated in Videira, Santa Catarina State, Brazil were utilized. Different fractions of the musts were obtained in a continuous process: free run juice (no pression applied), light pressing (0.5 – 1.0 bar) and heavy pressing (1.0 – 2.0 bar). Reduced glutathione (GSH) was added into the wines before bottling in a concentration of 10 mgL⁻¹. Oenological parameters, total polyphenols content, *o*-diphenols, total flavanols, antioxidant activity and browning index were evaluated by spectrophotometry and individual phenolic compounds and glutathione content were determined by high performance liquid chromatography. The oxidation adducts were synthesized utilizing a system of model solution containing caftaric or caffeic acid, glutathione or cysteine-glycine peptide and polyphenol oxidase enzyme (PPO). The reactions products were primarily identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) and the main compounds synthesized were elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR). For the method validation and application, white wines from Chardonnay variety were used, the multiple reactions monitoring method (UPLC-MS-MS) was validated and applied to quantify the oxidation adducts and their precursors in white wines elaborated with different treatments of protection against oxidation. The results obtained in this study showed that the pressing conditions of the must affected the chemical composition of the correspondent wines, leading to the higher extraction of phenolic compounds, especially caftaric acid, as well higher glutathione content. The glutathione addition in wines before bottling showed to have a protective effect on the main compounds of white wines, especially hydroxycinnamic acids, preventing the wine browning. In the synthesis reactions of oxidation products: 2-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid, 2-S-glutathionyl *trans*-caffeic acid and 2-S-cysteinylglycyl *trans*-caftaric acid

were the main compounds originated, however minor species were elucidated by NMR experiments: 2,5-di-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid; 2-S-glutathionyl *cis*-caftaric acid; 5-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid; 2,5-di-S-glutathionyl *trans*-caffeic acid; 5-S-glutathionyl *trans*-caffeic acid; 2-S-glutathionyl *cis*-caffeic acid; 6-S-glutathionyl *trans*-caffeic acid; 2-S-cysteinylglycyl *cis*-caftaric and 5-S-cysteinylglycyl *trans*-caftaric. The UPLC-MS-MS method for the quantification of the main oxidation products and their precursors in wines was developed and validated, in 26 minutes of chromatographic run it was possible to quantify 13 compounds in white wines: 2-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid, 2-S-glutathionyl *trans*-caffeic acid and 2-S-cysteinylglycyl *trans*-caftaric acid, caftaric acid (*cis* and *trans*), caffeic, coumaric and coumaric acids, coumaric glucoside (1 and 2), ferulic glucoside, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). Among the treatments to protect white wines against oxidation evaluated, the SO₂ addition at the moment of harvest and in the pneumatic press showed to be the more efficient.

Key words: Grape Pressing. White Wine Oxidation. Oxidation Adducts.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Uvas das variedades *Vitis vinifera* (A) Chardonnay; (B) Garganega; (C) Manzoni e (D) Sauvignon blanc. 30

Figura 2. Estrutura química: (a) glutathiona reduzida (GSH); (b) glutathiona oxidada (GSSG). 43

Figura 3. Esquema geral de reação entre glutathiona e *o*-quinonas dos compostos fenólicos em vinhos brancos. 45

Figura 4. Estrutura química dos principais adutos de oxidação. 49

Capítulo 3

Figura 1. Concentração de glutathiona total, reduzida e oxidada (mgL^{-1}) para amostras de vinhos brancos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionadas de glutathiona (10 mgL^{-1}) e amostras controle ao longo de 8 meses de guarda em garrafa 86

Figura 2. Índice de escurecimento (Abs 420 nm) para amostras de vinhos brancos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionadas de glutathiona (10 mgL^{-1}) e amostras controle ao longo de 8 meses de guarda em garrafa 88

Figura 3. Análise de componentes principais (ACP) utilizando as concentrações de ácidos hidroxicinâmicos, glutathiona (total, reduzida e oxidada) e índice de escurecimento de amostras Sauvignon blanc (SB), Manzoni (MZ) e Garganega (GG) com adição de glutathiona (GSH) (10 mgL^{-1}) e amostras controle (Control) com 8 meses de guarda em garrafa 90

Capítulo 5

Figura 1. Análise de Componentes Principais (ACP) para vinhos Chardonnay elaborados com diferentes tratamentos 115

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 1. Parâmetros enológicos clássicos de vinhos brancos Sauvignon blanc (SB), Manzoni (MZ) e Garganega (GG) adicionados de glutatona 10 mgL^{-1} e amostras controle 73

Tabela 2. Análises espectrofotométricas de vinhos Sauvignon blanc (SB), Manzoni (MZ) e Garganega (GG) adicionados de glutatona (GSH) 10 mgL^{-1} e amostras controle durante 8 meses de guarda em garrafa 74

Tabela 3. Compostos fenólicos individuais (mgL^{-1}) em vinhos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionados de glutatona (GSH) 10 mgL^{-1} e amostras controle armazenadas durante 8 meses de tempo de guarda em garrafa. 78

Tabela 4. Ácidos fenólicos (mgL^{-1}) em vinhos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionados de glutatona (GSH) 10 mgL^{-1} e amostras controle durante 8 meses de tempo de guarda em garrafa. 82

Capítulo 5

Tabela 1. Parâmetros de UPLC-DAD-MRM-MS otimizados, para os compostos estudados: GRP, *2-S-glutathionyl caffeic acid*, *2-S-cysteinyl cftaric acid*, ácidos hidroxicinâmicos, glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e glucogalina 107

Tabela 2. Parâmetros de validação do método: Coeficiente de Correlação (r^2), Limites de Detecção e Quantificação (LOD e LOQ), Recuperação, Repetibilidade e Reprodutibilidade em vinho branco 109

Tabela 3. Adutos de reação de oxidação e seus precursores (mgL^{-1}) em vinhos Chardonnay elaborados com diferentes tratamentos 112

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	– ácido 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ACP	– análise de componentes principais
DAD	– detector de arranjo de diodo (do inglês: <i>diode array detector</i>)
DMACA	– 4-dimetilaminocinamaldeído
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
GRP	– produto de reação da uva (do inglês: <i>grape reaction product</i>)
GSH	– glutationa reduzida
GSSG	– glutationa oxidada
LOD	– limite de detecção
LOQ	– limite de quantificação
MRM	– monitoramento de reações múltiplas (do inglês: <i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	– detector de massas
NDA	– naftaleno 2,3-dicarboxialdeído
PT	– polifenóis totais
RSD	– desvio padrão relativo (do inglês: <i>relative standard deviation</i>)
SPE	– extração em fase sólida (do inglês: <i>solid phase extraction</i>)
SST	– sólidos solúveis totais
TCEP	– tris (2-carboxietil) fosfana
UPLC	– cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês: <i>ultra performance liquid chromatography</i>)
UV-Vis	– ultravioleta-visível.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1 Videira -Uva.....	27
1.1 Variedades <i>Vitis vinifera</i>	28
2 Vinho	30
2.1 Processo de vinificação de vinhos brancos	31
2.2 Principais compostos de uvas e vinhos brancos	34
2.3 Oxidação de mostos e vinhos brancos e Glutathione	47
2.4 Atividade Antioxidante	50
CAPÍTULO 2 - Impact of pressing conditions on the phenolic composition, radical scavenging activity and glutathione content of Brazilian <i>Vitis vinifera</i> white wines and evolution during bottle ageing	63
CAPÍTULO 3 - Oxidação de vinhos brancos: Uso da glutathione na prevenção do escurecimento e o impacto na composição fenólica	65
Resumo	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Microvinificação	67
2.2 Reagentes Químicos	68
2.3 Métodos.....	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Parâmetros Enológicos.....	72
3.2 Análises Espectrofotométricas	73
3.3 Análises Cromatográficas	77
4 CONCLUSÃO	91
5 REFERÊNCIAS	92
CAPÍTULO 4 - Synthesis, identification and structure elucidation of adducts formed by reactions of hydroxycinnamic acids with glutathione or cysteinylglycine.....	97
CAPÍTULO 5 - Oxidação em vinhos brancos: Desenvolvimento e validação de método UPLC-MRM-MS para a quantificação simultânea de adutos, produtos de oxidação, e seus precursores em vinhos.....	99
RESUMO	99
1 INTRODUÇÃO	100
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	102

2.1 Padrões e reagentes.....	102
2.2 Amostras	102
2.3 Métodos	103
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
3.1 Otimização e validação de método de UPLC-MRM-MS	105
3.2 Validação do método	108
3.3 Análise de vinhos brancos com diferentes tratamentos	111
4 CONCLUSÃO	117
5 REFERÊNCIAS	119
CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
APÊNDICE A - Cromatogramas de UPLC-MRM-MS para os compostos validados: adutos de oxidação, ácidos hidroxicinâmicos, glutathiona e glutathiona oxidada em amostra de vinho branco.	125

INTRODUÇÃO

O vinho é a bebida resultante da fermentação alcoólica realizada pelas leveduras a partir dos açúcares presentes no mosto de uvas. As características sensoriais dos vinhos estão diretamente relacionadas com a composição química e com o processo de vinificação (CLARKE; BAKKER, 2004). Nesse contexto, as operações pré-fermentativas são fatores decisivos para a qualidade do produto final e devem promover a difusão de certas substâncias da casca da uva para o mosto, especialmente aromas frutados e precursores de aromas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Vinhos brancos contêm diversas classes de polifenóis, principalmente derivados hidroxicinâmicos, incluindo ésteres dos ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico (MAKRIS et al., 2003).

Vinhos brancos são particularmente sensíveis aos fenômenos de oxidação e a exposição ao oxigênio leva a perdas das características de aroma, desenvolvimento de caracteres atípicos de envelhecimento e mudanças indesejáveis de cor. A glutatona (GSH), um tripeptídeo presente naturalmente nas uvas e no vinho, tem um papel fundamental na prevenção da oxidação de mostos de uvas brancas, reagindo com as *o*-quinonas formadas durante as reações de oxidação, originando adutos de oxidação e evitando a formação de pigmentos escuros, diminuindo o escurecimento (SINGLETON et al., 1985; DU TOIT et al., 2006). A relação ácidos hidroxicinâmicos/GSH no mosto é uma boa indicação da susceptibilidade à oxidação, sendo que maiores razões levam a mostos com maiores índices de escurecimento (CHEYNIER, et al., 1990).

Buscar estratégias para aprimorar e preservar a qualidade dos vinhos brancos representa vantagens diante de um mercado tão competitivo. A adição de glutatona e otimização das técnicas de prensagem são alternativas interessantes para a produção de vinhos de qualidade. Além de proteger o mosto e o vinho contra a oxidação, a glutatona possui um efeito protetor sobre diversos compostos aromáticos durante o envelhecimento como os tióis voláteis, ésteres e terpenos, além de dificultar o desenvolvimento de certos compostos responsáveis por características sensoriais atípicas (Mattivi et al., 2012; Di Lecce et al., 2013). Altos níveis de glutatona no mosto e nos vinhos permitem que menor quantidade de dióxido de enxofre (SO₂) seja adicionada, proporcionando benefícios à saúde, já que existem grandes preocupações quanto à presença desse composto em vinhos. Devido ao grande interesse em quantificar e avaliar os mecanismos de oxidação em mostos e vinhos, métodos rápidos, sensíveis e precisos são necessários para análises de

produtos de oxidação bem como de seus precursores (ácidos hidroxicinâmicos e glutatona).

Este trabalho teve como objetivos: avaliar o efeito da pressão durante a etapa de prensagem do mosto e adição de glutatona na composição química de vinhos brancos e avaliar as principais características durante o armazenamento em garrafa; sintetizar, identificar e elucidar a estrutura de compostos originados em reações de oxidação envolvendo ácidos hidroxicinâmicos e glutatona ou cisteinil-glicina, bem como desenvolver um método para quantificação simultânea desses compostos e seus precursores em vinhos elaborados com diferentes tratamentos de proteção da oxidação.

Esta tese está estruturada na forma de capítulos, o primeiro capítulo corresponde a revisão bibliográfica e os demais capítulos reportam resultados desta pesquisa, elaborados na forma de artigos científicos. Os capítulos 4 e 5 correspondem ao trabalho desenvolvido durante o estágio de doutoramento no Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) em Montpellier na França.

O capítulo 1, Revisão Bibliográfica, abrange viticultura, com destaque para variedades *Vitis vinífera* utilizadas neste trabalho, composição química e processo de vinificação de vinhos brancos, reações de oxidação e atividade antioxidante.

No capítulo 2 foi avaliado o impacto de diferentes condições de prensagens do mosto elaborados com uvas *Vitis vinífera* durante a etapa pré-fermentativa, sobre a composição química dos mostos bem como dos vinhos elaborados com estes mostos ao longo do armazenamento em garrafa durante 8 meses. Foram quantificados compostos bioativos, concentração de glutatona e a atividade antioxidante.

O capítulo 3 reporta resultados sobre o efeito da adição de glutatona em vinhos brancos antes do engarrafamento, na composição química destes vinhos (compostos bioativos, atividade antioxidante, glutatona e índice de escurecimento) durante um período de 8 (oito) meses de armazenamento em garrafa.

O capítulo 4 apresenta resultados referentes à síntese de adutos de oxidação originados durante a reação de oxidação de ácidos hidroxicinâmicos e glutatona na presença da enzima polifenol oxidase (PPO). Os adutos de oxidação sintetizados foram identificados por espectrometria de massas e a elucidação estrutural foi realizada através de experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN). Alguns adutos de oxidação foram elucidados pela primeira vez.

O capítulo 5 apresenta o desenvolvimento e validação de um método de espectrometria de massas de monitoramento de reações

múltiplas (UPLC-MRM-MS) para a quantificação de adutos de oxidação e compostos precursores em vinhos. O método foi aplicado para a quantificação destes compostos em vinhos brancos elaborados com tratamentos de proteção da oxidação.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Videira -Uva

A videira é uma das espécies frutíferas mais conhecidas desde a antiguidade, é pertencente ao gênero *Vitis*, da família Vitaceae. Sua difusão no mundo ocorreu em duas direções principais: Américo-asiática e Euro-asiática, originando respectivamente as variedades americanas (*Vitis labrusca*) e européias (*Vitis vinifera*) (JACKSON, 2008). O cultivo da videira aconteceu de forma progressiva, incentivado principalmente pela associação do vinho com a religião. Dessa forma, o vinho se tornou parte intrínseca da cultura nos países da Europa, e durante o período de colonização os europeus levaram como bagagem para os novos países, a tradição do cultivo da uva e produção do vinho. Com o passar dos séculos, além de fazer parte da cultura, o vinho se tornou um importante fator econômico (SANDLER; PINDER, 2003).

As uvas alcançam a maturação quando vários fatores estão em equilíbrio, e assim possibilitando a produção de vinhos com alta qualidade. Características aromáticas e composição fenólica devem ser consideradas ao avaliar a maturação e são decisivas para a colheita das uvas. As características da composição fenólica incluem a concentração de substâncias, como também a estrutura dos compostos e capacidade de extraí-los a partir das uvas durante o processo de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

A baga da uva é formada pela semente, polpa e casca. Estes órgãos possuem diferentes componentes, contribuindo para características distintas do vinho. A casca da uva, que representa aproximadamente 10% do peso da baga, é responsável pela pigmentação, sabor e aroma. A polpa constitui a maior parte do peso da baga ($\approx 78\%$), composta de açúcares (glicose e frutose), ácidos orgânicos (tartárico e málico), cátions minerais (principalmente potássio), compostos nitrogenados (proteínas, substâncias amoniacais e aminoácidos), substâncias pécticas (polímeros de ácido galacturônico), entre outros compostos. A semente representa a menor proporção ($\approx 4\%$ do peso da baga), contribui significativamente com compostos responsáveis pelos atributos de adstringência e amargor. Em variedades de uvas brancas, a concentração de compostos fenólicos é mais baixa, tanto na polpa quanto no mosto, quando comparada com

variedades de uvas tintas, havendo predominância de compostos derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os derivados hidroxicinâmicos compreendem a maior parte dos compostos fenólicos não flavonóides encontrados em vinhos brancos (JACKSON, 2008).

1.1 Variedades *Vitis vinifera*

Variedade Chardonnay

Dentre as variedades de uvas brancas, a Chardonnay (Figura 1A) é a variedade mais cultivada no mundo, principalmente França e na região da Califórnia nos Estados Unidos. Esta variedade é originária da França, além de ser utilizada para produzir vinhos finos de alta qualidade, essa variedade é frequentemente utilizada para produção de excelentes espumantes. O vinho elaborado com esta variedade é muito versátil, e pode desenvolver diferentes características e pode ser utilizado em cortes com outras variedades como Semillon e Colombard. Sob boas condições de vinificação, o vinho desenvolve toques que lembram frutas como maçã, pêssego e melão (JACKSON, 2008). Os cachos são pequenos, cilíndricos e compactos e as bagas são redondas e pequenas (KERRIDGE; ANTCLIFF, 1999). Dependendo do local onde a uva é cultivada, o vinho produzido com esta variedade pode apresentar características frescas e acidez firme, excelente para a produção de espumantes, ou características amanteigadas, geralmente levado ao envelhecimento em barril de carvalho. Geralmente vinhos da variedade Chardonnay devem ser consumidos dentro de dois a cinco anos, com algumas exceções. O grau alcoólico pode ser baixo com valores de 7-8% ou maior 15-16% (SKELTON, 2007).

Variedade Garganega

A variedade Garganega (Figura 1B) é uma antiga variedade originária da região do Vêneto (Soave D.O.C. e Recioto di Soave D.O.C.) no nordeste da Itália. Esta variedade apresenta cachos alongados e alados. O vinho produzido a partir desta variedade possui cor amarelo-palha, com aroma intenso, sabor frutado seco com ligeiro toque de amêndoa amarga. Essa variedade é muito produtiva e resistente, sua maturação é mais tardia que outras variedades brancas cultivadas na Itália. É frequentemente utilizada desidratada para a produção do *Recioto di Soave D.O.C.G.*, um tradicional vinho licoroso italiano (KERRIDGE; ANTCLIFF, 1999).

Variedade Manzoni

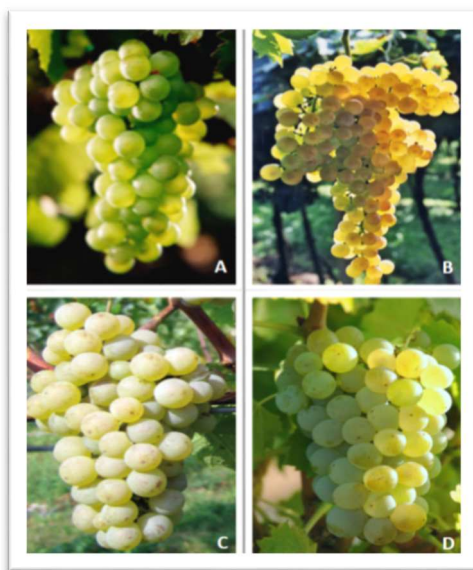
Também conhecida como Manzoni Bianco, esta variedade *V. vinifera* foi obtida do cruzamento entre as variedades Riesling e Pinot Blanc, realizado por Luigi Manzoni na Região do Veneto na Itália. Manzoni (Manzoni Bianco) é um dos cruzamentos com maior sucesso e mais cultivada na Região do Vêneto, especialmente em Treviso onde são elaborados vinhos varietais e cortes. A variedade Manzoni (Figura 1C) se adapta facilmente a diferentes condições climáticas e de solo, possuindo boa resistência e facilitando o cultivo. É utilizada para a produção de vinhos brancos finos, porém pode ser também empregada na elaboração de espumantes. O vinho produzido com a variedade Manzoni possui um alto teor de açúcar associado com uma boa acidez, a coloração é amarelo-palha com reflexos esverdeados e aroma delicado (KERRIDGE; ANTCLIFF, 1999).

Variedade Sauvignon blanc

Originária da França, principalmente região do Vale do Loire, esta variedade *V. vinifera* foi amplamente difundida em diversas zonas vitícolas do mundo. As uvas desta variedade (Figura 1D) apresentam cachos compactos, bagas pequenas redondas ou levemente ovais. O vinho de Sauvignon blanc pode apresentar características distintas, dependendo do clone utilizado e das práticas de vinificação. De forma geral, o vinho apresenta características amarelo palha, aromático, aveludado, com acidez equilibrada (SKELTON, 2007). Dentre os aromas frequentemente encontrados, destacam-se toques de pimentão verde e herbáceo, alguns clones podem desenvolver características florais (JACKSON, 2008).

As características aromáticas dos vinhos de Sauvignon blanc se desenvolvem principalmente durante a fermentação alcoólica. Altas temperaturas durante o contato com a casca e altas pressões durante a prensagem podem levar ao aumento de precursores de alguns compostos aromáticos característicos desta variedade (MAGGU et al., 2007).

Figura 1. Uvas das variedades *Vitis vinifera* (A) Chardonnay; (B) Garganega; (C) Manzoni e (D) Sauvignon blanc.



Fonte: Elaborado pela autora (2016)

2 Vinho

O vinho é a bebida resultante da fermentação alcoólica realizada pelas leveduras a partir dos açúcares presentes no mosto de uvas. A produção do vinho data desde a antiguidade, com registros no antigo Egito e Mesopotâmia. Posteriormente a prática do cultivo da uva e produção do vinho foi estabelecida na Europa, principalmente em países como França, Itália e Espanha e difundida para outros continentes pelos imigrantes europeus. As características sensoriais do vinho estão diretamente relacionadas com a composição química e com o processo de vinificação (CLARKE; BAKKER, 2004).

Dentre as frutas cultivadas na antiguidade, somente a uva possuía sua reserva de carboidratos na forma de açúcares solúveis, facilitando assim a metabolização pelas leveduras. Em outras frutas cultivadas, a reserva de carboidratos se encontrava em maior parte na forma de amido ou pectinas, que não eram fermentados pelas cepas de leveduras. Além disso, a quantidade considerável de ácidos, principalmente ácido tartárico, impedia o crescimento de bactérias e fungos no vinho,

conferindo um caráter fresco à bebida. A ação combinada da acidez da uva juntamente com o acúmulo de etanol suprimia o potencial crescimento de microrganismos que poderiam deteriorar o vinho. Dessa forma, a fermentação da uva representava a transformação de uma fruta perecível em uma bebida estável com propriedades nobres. O vinho pode ser classificado em diversas maneiras, de acordo com a cor, estilo, conteúdo de álcool ou de açúcar, variedade utilizada, origem geográfica, etc (JACKSON, 2008).

Vinhos brancos são mais instáveis do que vinhos tintos, principalmente devido à ausência de alguns compostos como as antocianinas. A diversidade e qualidade dos vinhos brancos resultam da variedade de uva, da qualidade e características do solo, região, clima, e das técnicas de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). De forma geral o vinho branco é caracterizado por um aroma fresco e frutado, cor pálida e um gosto levemente ácido (GARDE-CEERDÁN et al., 2008).

Vinhos brancos podem ser consumidos jovens, como também podem desenvolver suas melhores características com o envelhecimento. Aroma varietal complexo, requinte e intensidade são as qualidades primárias de um vinho branco. A qualidade de um vinho branco é relacionada com a expressão varietal, ou mais precisamente com seu perfil aromático característico de um determinado *terroir*. Componentes de aroma da fermentação estão presentes em todos os vinhos e são muito estáveis ao longo do tempo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

2.1 Processo de vinificação de vinhos brancos

O vinho branco é obtido a partir da fermentação alcoólica do mosto ou suco da uva. É a ausência de contato com a casca durante a fermentação que difere o processo de vinificação de vinhos brancos e vinhos tintos. Vinhos brancos podem ser elaborados a partir de uvas tintas, se a prensagem for realizada em condições que não permitam a extração de antocianinas e a coloração do mosto. O contato com os sólidos da uva ocorre na fase pré-fermentativa, onde não há presença de álcool (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; 2006b).

A partir do momento da colheita, as uvas sofrem uma série de reações que afetam a composição fenólica final do vinho. Técnicas de colheita, métodos de extração, contato com a casca antes da fermentação e prensagens influenciam tanto na concentração total de compostos fenólicos como também na concentração individual de cada polifenol encontrado no vinho terminado. O uso da maceração com a casca antes da fermentação e a aplicação de pressão durante a fase pré-fermentativa

pode ser empregado pelos vitivinicultores para alcançar uma boa expressão das características varietais no vinho. Essas estratégias são baseadas no conhecimento de que os compostos responsáveis pelas características sensoriais nas variedades de uvas estão concentrados em sua maioria intracelularmente, logo abaixo da casca das uvas (DARIAS-MRATÍN; DÍAZ-GONZÁLEZ; DÍAZ-ROMERO, 2004; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

A colheita de uvas brancas para a produção de vinhos de qualidade requer mais cuidado do que a colheita de uvas tintas, pois essas uvas são mais sensíveis a reações de oxidação. As uvas devem ser colhidas saudáveis, com maturidade enológica (conteúdo de açúcar, acidez e aroma) o mais uniforme possível. Além disso, a temperatura ambiente deve ser menor do que 20 °C e em climas mais quentes a colheita deve ser realizada à noite ou nas primeiras horas da manhã, a umidade deve ser evitada. A colheita pode ser realizada mecanicamente ou de forma manual, de uma só vez ou em estágios. Além do aroma varietal, o equilíbrio de acidez, suavidade, estrutura, corpo e persistência também desempenham um papel importante na qualidade de vinhos brancos, a utilização de uvas saudáveis e maduras é essencial para a obtenção desses parâmetros (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

O processo de vinificação para vinhos brancos é realizado através de uma técnica diferenciada na qual ocorre uma otimização da fase pré-fermentativa e as trocas entre o mosto e as partes sólidas da uva são cuidadosamente controladas. Nesse tipo de vinificação o processo de extração dos compostos do mosto é muito importante, exercendo grande influência nas características do vinho. O contato com a casca durante a preparação do mosto visa aprimorar as características frutadas e florais do vinho, sendo que um maior tempo de contato pode aumentar a adstringência e o sabor amargo devido à maior concentração de compostos como ácidos hidroxycinâmicos e taninos (DARIAS-MARTÍN et al., 2000; SELLI et al., 2006; LIBERATORE et al., 2010). A vinificação de vinho branco inclui uma extração controlada dos componentes da uva, limitando a difusão de substâncias capazes de gerar falhas gustativas e olfatórias (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Prensagem

A elaboração do mosto constitui uma etapa muito importante para a produção de vinhos brancos de qualidade, principalmente devido às reações de escurecimento. Durante a prensagem das uvas, ocorre a liberação de ácido *trans*-caftárico que é rapidamente oxidado a *o*-quinona

pela enzima polifenol oxidase (PPO) na presença de oxigênio. Na presença de glutatona essas *o*-quinonas formam compostos adutos, dentre esses compostos destaca-se o *2-S-glutathionyl trans-caftaric acid*, conhecido como produto de reação da uva ou GRP (*Grape Reaction Product*) e posteriormente se condensam com outros substratos fenólicos como os flavonóides. O GRP não é substrato para posterior oxidação, dessa forma não contribui para o escurecimento do mosto (CHEYNIER et al., 1990).

Técnicas pré-fermentativas como contato com a casca e prensagem influenciam na extração de precursores de compostos aromáticos levando a modificações na qualidade do vinho acabado. No entanto, o uso dessas práticas deve ser moderado, pois a extração exagerada de compostos fenólicos pode prejudicar a qualidade final de vinhos brancos (DARIAS-MRATÍN; DÍAZ-GONZÁLEZ; DÍAZ-ROMERO, 2004; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007).

Como observado por Darias-Martín, Díaz-González e Díaz-Romero (2004), a maceração do mosto e a prensagem das uvas acarreta em um aumento no conteúdo fenólico, sendo que, um aumento na pressão exercida sobre as uvas promove uma maior extração desses compostos. O contato prolongado com os sólidos da uva aumenta o conteúdo de compostos fenólicos. Os aromas varietais e precursores de aroma estão presentes principalmente na casca da uva, portanto, a qualidade do vinho branco depende das operações pré-fermentativas como a colheita, esmagamento, prensagem e clarificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). A prensagem é realizada para liberar o suco das uvas, após a separação do mosto pela prensagem obtém-se o drenado, esse processo deve ser rápido para evitar os fenômenos de oxidação (FLANZY, 2000). No processo de vinificação de vinhos brancos as condições de extração dos componentes da uva são completamente diferentes da vinificação para vinhos tintos. Como o fenômeno de maceração ocorre antes da fermentação alcoólica, as condições de tratamentos pré-fermentativos controlam a passagem para o mosto de compostos que são essenciais para a qualidade do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Fermentação

A fermentação alcoólica ocorre em tanques de fermentação com temperatura entre 4 a 6 °C. A duração da fermentação depende de vários parâmetros como condições de extração do mosto, concentração de açúcar e nitrogênio assimilável, turbidez, cepas de leveduras, aeração e temperatura de fermentação. A densidade do mosto é monitorada

diariamente para a determinação da concentração de açúcares e do momento em que a fermentação deve ser finalizada. Geralmente a fermentação é considerada completa quando a concentração de açúcares redutores no mosto é menor do que 2 g L^{-1} (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). A clarificação é realizada para eliminar matérias sólidas em suspensão presentes no vinho, conferindo a limpidez característica de vinhos brancos. A fermentação alcoólica deve ser concluída com os principais resultados: esgotamento dos açúcares fermentáveis e obtenção de um aroma de qualidade, principal elemento para a qualidade de vinhos brancos. Após a fermentação alcoólica, o vinho é engarrafado para sua comercialização e consumo (FLANZY, 2000).

O envelhecimento em barril é uma prática comum para vinhos tintos, porém, também pode ser empregada em vinhos brancos. Alguns vinhos de variedades como Riesling, Chenin Blanc ou Colombard são consumidos um ou dois anos após o engarrafamento, alcançando nesse período um “bouquet de envelhecimento”, porém em outros vinhos brancos a oxidação de terpenos e a hidrólise de acetatos e ésteres de ácidos graxos durante o envelhecimento podem contribuir para a perda de caráter floral e frutado de vinhos brancos jovens. O envelhecimento em barril de carvalho requer um constante monitoramento. Como alternativa para o uso de barril, chips de carvalho podem ser utilizados, esses chips são adicionados aos tanques durante ou após a fermentação por um período curto de envelhecimento. Esse processo mantém algumas características florais e frutadas, e confere notas de carvalho, pimenta e baunilha ao vinho, melhorando suas impressões sensoriais (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

2.2 Principais compostos de uvas e vinhos brancos

Carboidratos

Os principais carboidratos das uvas são glicose e frutose. O seu conteúdo pode variar dependendo da variedade da uva e do grau de maturação. O conteúdo de açúcar (sólidos solúveis) pode ser medido em °Brix (JACKSON, 2008). Os açúcares desempenham um papel essencial na vinificação, constituem a fonte para a produção de álcool a partir da ação das leveduras durante a fermentação alcoólica, além disso, esses compostos contribuem para as características de aroma, corpo dos vinhos e principalmente no caso de vinhos brancos doces, para o sabor adocicado que pode ser mais ou menos intenso dependendo da quantidade em que estão presentes (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Os carboidratos podem participar de reações bioquímicas envolvendo a ação de enzimas como pectinases e celulases, e como resultado dessas reações, diferentes frações de carboidratos são produzidas. A adição de enzimas durante a vinificação é uma prática comum que visa melhorar a extração de compostos aromáticos, e no caso de vinhos brancos para a clarificação de mostos e vinhos. Além disso, os açúcares como a glicose são precursores de ácidos orgânicos como ácido cítrico, málico e succínico (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Com a maturação da uva o conteúdo de sólidos solúveis aumenta, indicando o estado ótimo de maturação. Os açúcares que permanecem no vinho após a fermentação são designados como açúcares residuais, e são basicamente pentoses como arabinose, ramnose e xilose (JACKSON, 2008).

O sabor adocicado, principal característica atribuída aos açúcares, é relacionado principalmente à sacarose, que está presente em vinhos brancos doces em uma concentração média de 60 mgL^{-1} , enquanto que é praticamente ausente em vinhos brancos secos. A frutose e a glicose podem estar presentes em vinhos brancos secos em concentrações de $25\text{-}178 \text{ mgL}^{-1}$ e $20\text{-}162 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente. O envelhecimento em barril pode mudar a concentração de açúcares no vinho. Apesar de constituir uma classe de compostos minoritários, esses compostos contribuem para as propriedades sensoriais e participam de diferentes reações durante a fermentação e envelhecimento, como reações com ácidos e bases, reação de *Maillard*, oxidação e redução (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Alcoóis

Além da água, o etanol é o composto mais abundante no vinho. A quantidade de etanol em vinhos é expressa em termos de teor alcoólico ou percentagem de álcool por volume. Nos vinhos, o álcool é principalmente produzido durante a fermentação alcoólica do açúcar presente no mosto. Entretanto, as células das uvas podem também formar pequenas quantidades principalmente sob condições anaeróbicas (maceração carbônica) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). O etanol possui diversos efeitos em vinhos, como realçar o sabor doce, modificar a percepção de acidez, sensação de calor, contribui para o corpo do vinho, além de reduzir a adstringência de taninos. Durante o envelhecimento pode reagir com ácidos orgânicos produzindo ésteres ou com aldeídos produzindo acetais (JACKSON, 2008).

A concentração de etanol em vinhos brancos pode variar de 8 a 16 % e reflete o tipo de vinho e grau de maturação das uvas com as quais foi

produzido. O conteúdo de etanol pode afetar as propriedades químicas, físicas e sensoriais do vinho como a viscosidade, sabor, acidez, aroma e textura. O glicerol também é produzido pela fermentação, porém em menores concentrações, os principais efeitos do glicerol são na viscosidade e no corpo do vinho (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Vonach, Lendl e Kellner (1998) encontraram glicerol em vinhos brancos com concentração mínima de 5,95 e máxima de 8,10 gL⁻¹.

Alcoóis com mais de dois átomos de carbono são designados como alcoóis superiores. A maioria desses compostos é produzida durante a fermentação e podem alcançar concentrações de 150 a 550 mgL⁻¹ nos vinhos. Esses compostos são formados pelas leveduras a partir de açúcares ou de aminoácidos no mosto, e desempenham um importante papel nas características aromáticas dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Podem promover características aromáticas positivas ou negativas para o vinho branco, dependendo da composição química do mesmo, são importantes para o perfil aromático de vinhos da variedade Chardonnay. Muitos fatores interferem na formação desses compostos durante a fermentação incluindo espécie e cepas de leveduras, quantidade de açúcar, temperatura de fermentação, pH e composição do mosto, nitrogênio assimilável, nível de aeração, conteúdo de sólidos, variedade de uva e tempo de contato com a casca (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos em vinhos procedem da uva (essencialmente da polpa) e do processo fermentativo durante a vinificação. O caráter e a concentração dos ácidos formados estão diretamente relacionados com as diferentes técnicas de elaboração do vinho. Os ácidos málico, tartárico, cítrico, ascórbico, oxálico e fumárico são exemplos de ácidos provenientes da uva. Ácidos acético, fórmico, láctico, succínico e pirúvico são originados no processo fermentativo (FLANZY, 2000). Esses compostos podem ser quantificados expressos como ácidos totais tituláveis. O desenvolvimento de ácidos nas uvas é dependente da fotossíntese e pode ser afetado pela temperatura ao longo da maturação (JACKSON; LOMBARD, 1993).

Esses ácidos contribuem para acidez, estabilidade da cor e conservação microbiológica dos vinhos, a diminuição nessa acidez pode provocar alterações de brilho, aroma e sabor, além disso, o vinho torna-se um meio muito susceptível do ponto de vista microbiológico (FLANZY, 2000). O ácido tartárico é um dos ácidos prevalentes em uvas

antes de atingir a maturação e no mosto, como esse ácido geralmente não está presente em outras plantas, torna-se característico de uvas e vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

O equilíbrio da acidez é uma característica essencial em vinhos principalmente brancos, a acidez em excesso realça a percepção de sabor ácido e adstringência enquanto que a baixa acidez reduz a harmonia do vinho. O ácido succínico é o ácido majoritário produzido pelo metabolismo das leveduras (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Em vinhos brancos os ácidos orgânicos podem ser quantificados individualmente através de métodos enzimáticos, espectrofotométricos baseados na reação desses compostos com outras substâncias produzindo compostos coloridos, métodos cromatográficos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa e por eletroforese capilar (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005). A concentração de ácidos orgânicos em vinhos brancos pode variar de acordo com as diferentes técnicas de vinificação e variedade da uva, a faixa de concentração de alguns ácidos orgânicos em vinhos brancos é 1,19 -3,22 gL⁻¹ para ácido tartárico, 1,97 -3,17 gL⁻¹ para ácido málico, 0,206-0,612 gL⁻¹ para ácido succínico, 0,15-0,25 gL⁻¹ para ácido acético, 0,41-0,78 gL⁻¹ para ácido láctico e 0,05-1,17 gL⁻¹ ácido cítrico (ARELLANO et al., 1997; VONACH; LENDL; KELLNER, 1998; MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007).

Compostos Fenólicos

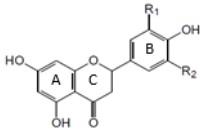
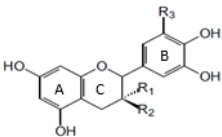
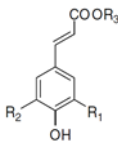
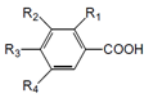
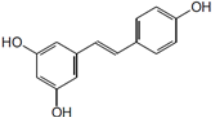
Compostos fenólicos são importantes em enologia, pois têm participação na qualidade dos vinhos. Do ponto de vista químico são caracterizados por um núcleo benzênico com um ou mais grupos hidroxilas (Quadro 1). A reatividade desse tipo de molécula deve-se tanto à presença do grupo funcional fenol como também ao anel benzênico que pode sofrer substituições eletrofilicas. Os compostos fenólicos presentes no vinho são provenientes da uva e originados durante o processo fermentativo. Durante a vinificação e o envelhecimento do vinho, os compostos fenólicos participam de diversas reações originando novas estruturas e compostos. Dessa maneira, a composição fenólica de um vinho depende da matéria prima, da técnica de vinificação utilizada, e das reações químicas e bioquímicas (FLANZY, 2000).

O acúmulo de determinados compostos fenólicos em diferentes partes da uva em um mesmo cacho permite a produção de vinhos com perfil fenólico variado, e dessa forma a criação de vinhos com estilos específicos. Em mostos de uvas brancas obtidos sem prensagem, os

compostos ácidos cinâmicos estão presentes em maiores concentrações que os demais compostos, já em mostos obtidos em prensagens observam-se maiores concentrações de compostos flavonóides devido à maior extração das sementes e cascas (PATEL et al., 2010).

Na área de enologia os compostos fenólicos são divididos em dois grandes grupos: *flavonóides* e *não-flavonóides* (Quadro 1). Os flavonóides mais encontrados em vinhos são catequinas, epicatequina (flavanóis), antocianinas (vinhos tintos), flavonóis como quercetina, campferol, miricetina. Os compostos não-flavonóides correspondem basicamente aos ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos), estilbenos e tirosol, são primariamente armazenados nos vacúolos celulares da casca e da polpa e são facilmente extraídos por prensagem (BRAVO, 1998; JACKSON, 2008).

Quadro 1 - Estrutura geral dos compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides.

Flavonóides					
<i>Flavonóis</i> (a)		$R_1 = H \ R_2 = H$ Campferol			
	$R_1 = OH \ R_2 = H$ Quercetina				
	$R_1 = OH \ R_2 = OH$ Miricetina				
<i>Flavanóis</i> (b)		$R_1 = OH \ R_2 = H \ R_3 = H$			
	(+) -catequina				
	$R_1 = H \ R_2 = OH \ R_3 = H$				
	(-) -epicatequina				
Não-flavonóides					
<i>Ácidos hidroxicinâmicos</i> (c)		R_1	R_2	R_3	
	Cafeico	OH	H	H	
	Caftárico	OH	H	ác. tartárico	
	<i>p</i> -Coumárico	H	H	H	
	Ferúlico	OCH ₃	H	H	
<i>Ácidos hidroxibenzóicos</i> (d)		R_1	R_2	R_3	R_4
	Gálico	H	OH	OH	OH
	Protocateico	H	OH	OH	H
	Siringico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Vanílico	H	OCH ₃	OH	H
<i>Estilbenos</i> (e)		<i>trans</i> -Resveratrol			
					

Fonte: Ribéreau-Gayon et al.(2006b).

A maior parte dos compostos não-flavonóides em vinhos brancos são os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados (hidroxicinamatos) são a classe de compostos fenólicos mais abundantes em vinhos brancos. A concentração desses ácidos na sua forma livre é muito baixa nos vinhos, a maior parte desses compostos está presente na forma de ésteres com ácido tartárico,

o mais abundante é o éster do ácido cafeico (ácido caftárico) (CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET, 1989). O ácido caftárico é o hidroxicinamato mais abundante tanto no mosto como no vinho branco. Como os ácidos hidroxicinâmicos são os compostos majoritários nesses vinhos, a influência desses compostos nas características sensoriais é alvo frequente de análises e pesquisas. A esses compostos geralmente são atribuídas características de amargor e adstringência. Em concentrações geralmente encontradas em vinhos brancos os hidroxicinamatos individuais parecem não apresentar características de amargor perceptíveis, porém a combinação de vários compostos hidroxicinâmicos pode representar um impacto nas características sensoriais de vinhos brancos (MAKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

O ácido hidroxibenzóico mais abundante em vinhos brancos é o ácido gálico. Ao contrário dos hidroxicinâmicos, esses ácidos são frequentemente encontrados na sua forma livre, porém em menores concentrações. O ácido gálico pode ser encontrado na forma livre nas uvas, e também pode ser liberado através da hidrólise das formas esterificadas com os flavanóis (BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2001; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Os estilbenos são compostos não-flavonóides presentes em diversas plantas, porém as uvas e o vinho são considerados a principal fonte na dieta humana. O composto mais estudado dessa classe é o *trans*-resveratrol. A síntese desse composto na uva é realizada principalmente na casca, onde é produzido como uma fitoalexina em resposta a infecções e estresse causado pelo meio ambiente. Apesar de existir no vinho sob duas formas isoméricas: *cis* e *trans*, na uva a forma *cis*-resveratrol é pouco encontrada. Podem estar combinados com glicosídeos, denominado *piceid* ou podem ainda ocorrer em formas oligoméricas e poliméricas chamadas de viniferinas, que são formadas a partir da polimerização oxidativa dos monômeros de resveratrol (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Os estilbenos são comumente encontrados nas cascas das uvas, dessa forma os vinhos tintos, que têm maior contato com os sólidos da uva durante a vinificação, possuem uma quantidade maior desse composto quando comparado com os vinhos brancos (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 1995; TRELA; WATERHOUSE, 1996).

A concentração de estilbenos em vinhos varia consideravelmente, e é dependente de diversos fatores como clima, variedade, infecções, radiação UV, íons de metais pesados e métodos de vinificação. Também pode ser influenciada pela atividade enzimática das leveduras (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). A concentração de *trans*-

resveratrol em vinhos brancos pode variar de 0,05 a 7,95 mgL⁻¹, e de *piceid* pode variar de 0,33 a 2,2 mgL⁻¹ (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU et al., 2006; FEIJÓO; MORENO; FALQUÉ, 2008; QUIRÓS; LAGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009; ANASTASIADI et al., 2010; VILANOVA et al., 2015).

O tirosol é um composto fenólico formado a partir da tirosina pelas leveduras durante a fermentação, sua concentração no vinho depende da cepa de levedura utilizada e da concentração inicial de açúcares e tirosina no mosto. Em alguns vinhos brancos o tirosol pode ser o composto fenólico predominante, como encontrado para vinhos brancos da região de Cariñena na Espanha. Diferentes práticas de vinificação podem afetar a concentração de tirosol no vinho (PEÑA-NEIRA et al., 2000).

Os flavonóides são compostos fenólicos formados por dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano central. As diferenças no estado de oxidação e substituição no anel pirano central definem as diferentes classes de flavonóides (WATERHOUSE, 2002; FULCRAND et al., 2006). Um maior período entre a colheita e a prensagem, principalmente se dióxido de enxofre for adicionado para prevenir a oxidação, aumenta as concentrações de compostos flavonóides em mostos e vinhos brancos (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Os compostos *flavonóis* estão presentes tanto na uva como também no vinho nas formas glicosiladas. Dentre esses compostos, a quercetina está presente em maiores concentrações, porém, miricetina e campferol também podem ser encontrados (VILANOVA; SANTALLA; MASA, 2009). Como o processo de vinificação tradicional para vinhos brancos envolve a fermentação do mosto extraído da polpa uva que contém menores quantidades desses compostos, a concentração dos mesmos em vinhos brancos é relativamente baixa. A concentração de flavonóis na casca das uvas pode aumentar com a exposição solar, sugerindo o papel desses compostos na proteção da uva contra danos fisiológicos causados por queimaduras do sol (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Outra importante classe de compostos flavonóides em vinhos são os flavanóis. Os flavanóis predominantes em vinhos brancos são: catequina e epicatequina, e estão presentes principalmente nas cascas e sementes das uvas (RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE et al., 2006). A baixa concentração desses compostos em vinhos brancos se deve ao pouco contato do mosto com essas partes da uva durante o processo de vinificação. Embora esses compostos estejam em baixas concentrações em vinhos brancos, seus níveis de percepção sensorial são mais baixos que outros polifenóis. O flavanol majoritário em vinhos, a catequina, tem

sido associado tanto com sabor amargo como também adstringência (ROBICHAUD; NOBLE, 1990).

Compostos nitrogenados

As proteínas, peptídeos e os aminoácidos constituem os principais compostos nitrogenados em mostos e vinhos. Destes, os aminoácidos são os mais estudados e mais conhecidos, servem de nutrientes para as leveduras durante a fermentação alcoólica e sua concentração e composição nos vinhos e mostos tem importante influência nas características aromáticas (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Os aminoácidos livres representam a maior e mais importante fonte de nitrogênio no mosto e no vinho, os níveis desses aminoácidos são influenciados não somente pela variedade de uva, área de produção e condições de vinificação, como também pelas cepas de leveduras e condições da fermentação alcoólica. Durante a fermentação alcoólica as leveduras modificam consideravelmente a distribuição de aminoácidos, através de degradações enzimáticas ou pelo próprio metabolismo durante a fase de crescimento. A cisteína é o precursor de vários aromas tióis no vinho, esse aminoácido reage facilmente com compostos que possuem o grupamento carbonila e dicarbonila (PRIPIS-NICOLAU et al., 2001).

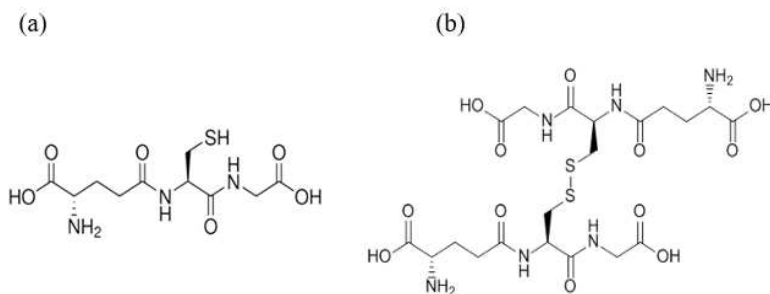
Os peptídeos formam um grupo heterogêneo de compostos, devido à ampla faixa de estruturas (composição aminoacídica e sequência de aminoácidos na cadeia). Em vinhos esses compostos são pouco conhecidos, apesar de envolvidos em diversas propriedades como as características sensoriais. Esses compostos também são nutrientes para as leveduras no mosto (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

As proteínas em uvas e vinhos são importantes, principalmente, devido à habilidade de agregação, em vinhos brancos formam precipitados visíveis causando turbidez com o envelhecimento. As proteínas também exercem impacto no aroma e sabor de vinhos. A concentração de proteínas em vinhos brancos pode variar de 20-260 mgL⁻¹, ainda assim, esses valores podem sofrer variações de um vinho branco para outro. Para evitar a precipitação das proteínas pode-se realizar um tratamento com agentes clarificantes como bentonite, essa prática remove algumas proteínas antes do engarrafamento do vinho, porém esse processo pode reduzir alguns compostos responsáveis pelas características sensoriais (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Glutationa

A glutatona (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina; GSH) é um tripeptídeo de L-glutamato, L-cisteína e glicina. O resíduo de cisteína livre de porção sulfidríla confere propriedades redox e nucleofílicas. Na célula é possível encontrar as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (Figura 2), geralmente mais de 90% da glutatona está presente na forma reduzida. A GSSG é formada a partir da oxidação da GSH, e pode ser reduzida novamente pela ação da enzima glutatona redutase. As principais funções da glutatona são antioxidante, reforçar a imunidade e desintoxicação. Em organismos vivos tem um importante papel na proteção contra o estresse oxidativo, eliminação de xenobióticos e outros metabolitos tóxicos (CARMEL-HAREL; STORZ, 2000; FAHEY, 2001; PENNINCKX, 2002; PASTORE et al., 2003). Nas plantas a GSH é sintetizada no citosol e cloroplastos das células vegetais (LIYANAGE; ADAMS, 1992). A glutatona é um componente natural de muitas plantas e alimentos, dentre suas propriedades estão prevenção de formação de radicais livres, detoxificação de células, inibição do escurecimento enzimático e não enzimático (LAVIGNE; PONS; DUBOURDIEU, 2007).

Figura 2 - Estrutura química: (a) glutatona reduzida (GSH); (b) glutatona oxidada (GSSG).



Fonte: Adaptado de Camera e Picardo (2002).

A glutatona reduzida (GSH) é o principal composto não proteico derivado do tiol presente em grandes quantidades nas células dos seres vivos, onde desempenha diversas funções como prevenir os danos oxidativos no organismo. A GSH se comporta como um sequestrador de radicais livres e também auxilia na regeneração de outros antioxidantes como a vitamina E e ácido ascórbico. A GSH é fundamental para a

homeostase das células e modificações quantitativas ou qualitativas são um indicador de danos oxidativos ao organismo (MEISTER, 1994).

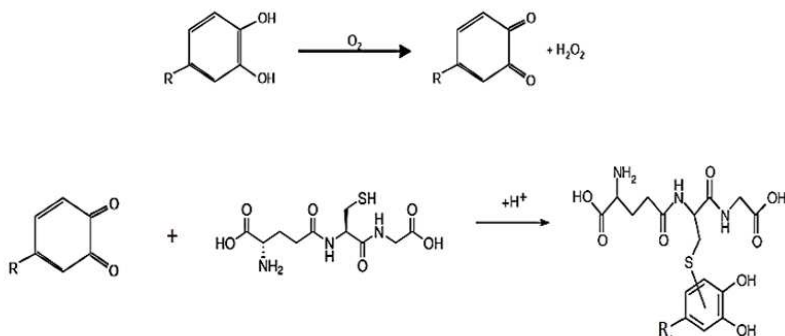
A uva é a primeira fonte de glutatona nos vinhos, a concentração de GSH em uvas pode exceder 100 mgKg^{-1} dependendo da variedade, condições ambientais e das práticas de cultivo. Tratamentos que aumentam a quantidade de nitrogênio disponível no solo durante a maturação pode aumentar a concentração de glutatona na uva. A concentração de GSH aumenta depois do *veraison*, independentemente da variedade e é proporcional a quantidade de açúcar (FRACASSETTI et al., 2011).

A glutatona foi quantificada em diferentes variedades de uvas em 1989 por Cheynier, Souquet e Moutounet, a concentração variou de 17-114 mgKg^{-1} . Essa variação não depende apenas da variedade de uva e também de fatores como safra, local e práticas tecnológicas. Mais de 90% do total de glutatona nas uvas durante o amadurecimento está na forma reduzida. O aumento de GSH em uvas pode estar relacionado com o aumento da contribuição dos componentes do floema para as bagas, esse aumento é acompanhado da diminuição da concentração de GSH nas folhas (LIYANAGE; ADAMS, 1992). A concentração de GSH em uvas é intimamente relacionada com a quantidade de nitrogênio assimilável no mosto. Uma fertilização do solo com nitrogênio resulta em um mosto com cerca de seis vezes mais nitrogênio assimilável pelas leveduras, bem como altos níveis de precursores de cisteína conjugada e GSH (DU TOIT et al., 2006).

O conteúdo de GSH no mosto é altamente variável, concentrações variando de 0,001 a 100 mg L^{-1} foram reportadas (CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET, 1989; DU TOIT et al., 2007; MAGGU et al., 2007; JANEŠ; LISJAK; VANZO, 2010; FRACASSETTI et al., 2011). Diversos fatores podem influenciar a concentração de GSH no mosto como exposição ao oxigênio, atividade da enzima tirosinase, maceração com a casca e a prensagem durante os processos pré-fermentativos (MAGGU et al., 2007; DU TOIT et al., 2007; PATEL et al., 2010). O mosto simples sem prensagem (*free run juice*) é caracterizado por altas concentrações de GSH quando comparado com as frações resultantes de altas prensagens (PATEL et al., 2010). Durante a fermentação alcoólica pode haver o aumento ou a diminuição do conteúdo de GSH. As concentrações iniciais de glutatona oxidada (GSSG) no mosto são baixas, aumentando no final da fermentação principalmente em mostos de variedades de uvas brancas (PARK; BOULTON, NOBLE, 2000; DU TOIT et al., 2007; LAVIGNE; PONS; DUBOURDIEU, 2007; PATEL et al., 2010).

Em vinhos brancos, a glutatona desempenha um importante papel na prevenção das reações de oxidação, prevenindo o escurecimento e podendo melhorar o potencial de maturação desses vinhos. Os ácidos hidroxicinâmicos, principalmente o ácido caftárico são os primeiros substratos para as enzimas oxidativas como a polifenol oxidase (PPO), dessa forma estão intimamente envolvidos no escurecimento oxidativo de mostos e vinhos brancos. A glutatona pode interferir nos mecanismos de oxidação capturando as *o*-quinonas formadas a partir do ácido caftárico formando o produto de reação da uva (GRP), a formação desse produto limita o escurecimento do mosto e a glutatona é consumida, reduzindo sua concentração (JANEŠ; LISJAK; VANZO, 2010). A Figura 3 apresenta um esquema da reação entre glutatona e *o*-quinonas em vinhos brancos. O sítio de adição da glutatona na molécula depende do tipo de composto fenólico envolvido na reação.

Figura 3 - Esquema geral de reação entre glutatona e *o*-quinonas dos compostos fenólicos em vinhos brancos.



Fonte : Sonni et al. (2011a)

Além de prevenir o escurecimento, a GSH pode prevenir a perda de aromas varietais característicos de vinhos brancos devido aos processos oxidativos (FRACASSETTI et al., 2011). Segundo Marchand e Revel (2010), a glutatona está envolvida no perfil aromático de vinhos brancos. As *o*-quinonas formadas no processo de oxidação reagem formando peróxidos que possuem ação contra os tióis voláteis presentes nos vinhos. A proteção da oxidação desses tióis exercida pela glutatona é baseada na competição, como a glutatona também é um tiol, compete com os tióis aromáticos pela ligação com *o*-quinonas consequentemente limitando a perda das características aromáticas dos vinhos. A concentração de glutatona em vinhos é mais baixa do que nos mostos e

nas uvas das quais são elaborados, apresentando uma ampla faixa de variação (não detectado a $34,70 \text{ mgL}^{-1}$) (PARK; BOULTON, NOBLE, 2000; Du TOIT et al., 2007; LAVIGNE; PONS; DUBOURDIEU, 2007; JANEŠ; LISJAK; VANZO, 2010; MARCHAND; REVEL, 2010; FRACASSETTI et al., 2011).

A glutatona está presente em altas concentrações em leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada para a fermentação alcoólica do mosto, dessa forma a concentração de glutatona no vinho sofre grande influência da cepa de levedura utilizada bem como do seu processo metabólico durante a fermentação alcoólica. As leveduras podem metabolizar a glutatona, liberando-a no vinho no final da fermentação alcoólica através da autólise. A glutatona é importante para o metabolismo das leveduras, seus níveis mudam durante a fermentação alcoólica. Algumas preparações de leveduras inativadas são enriquecidas com GSH, com intuito de proteger a cor, o frescor e aroma de vinhos brancos, bem como diminuir a velocidade de formação de aromas indesejáveis originados nas reações de oxidação, diminuir o amargor e favorecer a eliminação de polifenóis adstringentes (PENNINCKX, 2002; MARCHAND; REVEL, 2010).

Durante o armazenamento e envelhecimento dos vinhos ocorre uma redução na concentração de glutatona. A exposição ao oxigênio e as reações de oxidação são as principais causas da redução na concentração de glutatona nos vinhos ao longo do tempo de armazenamento e envelhecimento em garrafa. Dessa maneira, a evolução desse composto durante a vinificação e envelhecimento pode mudar drasticamente podendo ser aumentada quando a quantidade de oxigênio é limitada tanto na vinificação como durante o envelhecimento (LAVIGNE; PONS; DUBOURDIEU, 2007; UGLIANO et al., 2011).

A adição de glutatona em vinhos pode ser uma alternativa para prevenir o escurecimento oxidativo de vinhos brancos. A adição de glutatona antes do engarrafamento pode reduzir os fenômenos de oxidação, preservando a cor do vinho e alguns compostos aromáticos varietais, além de reduzir aromas indesejáveis (POZO-BAYÓN; ANDÚJAR-ORTIZ; MORENO-ARRIBAS, 2009). Em assembleia realizada pela OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), a adição de glutatona, em concentrações até 20 mgL^{-1} , em vinhos com intuito de prevenir a oxidação e preservar as características do aroma, foi recentemente adotada como prática enológica permitida (OIV, 2015).

A quantificação da glutatona é frequentemente realizada após uma reação de derivatização, devido à falta de grupos cromóforos e fluoróforos na sua estrutura química. Compostos apropriados são

introduzidos na molécula e aumentam o limite de detecção no UV-vis como também possibilitam a detecção em detector de fluorescência. O reagente derivatizante deve proporcionar uma alta sensibilidade e especificidade para o método de detecção, além de não ser susceptível a interferentes presentes na matriz. A separação e quantificação da GSH e análogos por HPLC com detecção de fluorescência tem sido amplamente empregada, devido à alta sensibilidade (PARK; BOULTON, NOBLE, 2000; JANEŠ; LISJAK; VANZO, 2010; ANDUJAR-ORTIZ et al., 2012).

2.3 Oxidação de mostos e vinhos brancos e Glutathione

A cor constitui um importante parâmetro de qualidade em vinhos brancos. Reações de oxidação que ocorrem em mostos e vinhos levam ao escurecimento, afetando a qualidade destes produtos e encurtando o tempo de prateleira (Du Toit et al., 2006). O tempo de prateleira do vinho branco é uma das principais preocupações na indústria, e em geral está diretamente relacionado com sua resistência à oxidação. Os compostos fenólicos nos vinhos passam por diferentes condensações mediadas por oxigênio até finalmente precipitar como pigmentos escuros, causando sérias mudanças nas características do vinho. As reações de escurecimento e consequente, perda do frescor e das características frutadas, podem acontecer em semanas ou meses, ou em períodos mais longos como anos após o engarrafamento, dependendo principalmente das características e do tipo de vinho e das condições de armazenamento (CUTZACH; CHATONNET; DUBOURDIEU, 2000; HERNANZ et al., 2009).

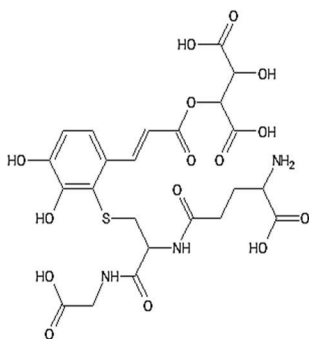
Os compostos fenólicos, particularmente os *o*-difenois, são os principais componentes em vinhos relacionados com a oxidação, que promovem modificações de cor (escurecimento) e sabor (perda ou aumento da adstringência). Durante a prensagem, a membrana que envolve a baga da uva é rompida e a enzima polifenol oxidase (PPO) é liberada, presença de oxigênio a oxidação enzimática converte rapidamente os hidroxycinamatos a *o*-quinonas. Essa reação está relacionada, em parte, com a presença da função fenol e a mobilidade do átomo de hidrogênio na molécula dos polifenóis. No processo de oxidação, a forma reativa é uma molécula sem prótons, ao ceder um elétron o ânion fenolato se transforma em radical semi-quinona. O produto da oxidação depende, principalmente, do número de hidroxilas presentes no composto inicial. Se a reação ocorre a partir de um monofenol, o radical semi-quinona gerado reage com um segundo radical para

originar um produto de acoplamento, porém se a reação partir de um catecol (duas hidroxilas na posição *orto*) o radical semi-quinona perde um elétron e origina uma *o*-quinona (CILLIERS; SINGLETON, 1989; OSZMIANSKI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1996).

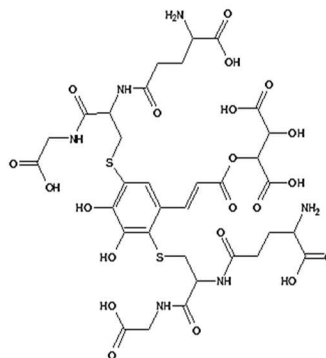
Em presença de glutatona, ocorre a substituição no anel eletrofílico da *o*-quinona formando adutos de oxidação, esses compostos não são substratos para a enzima polifenol oxidase diminuindo as reações de oxidação. Enquanto existe glutatona disponível no meio, as *o*-quinonas são aprisionadas e impedidas de participar nas reações de polimerização que levam ao escurecimento irreversível do mosto. A relação ácidos hidroxycinâmicos/GSH no mosto é uma boa indicação da susceptibilidade à oxidação, sendo que maiores razões levam a mostos com maiores índices de escurecimento (CHEYNIER, et al., 1990; CHEYNIER; RIGAUD; MOUTOUNET, 1990).

A glutatona está naturalmente presente em uvas e vinhos e sua reatividade com polifenóis, particularmente ácidos hidroxycinâmicos durante o processo de oxidação é bem descrita na literatura (CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET, 1989; PENNINCKX, 2002). Quando em concentração suficiente no meio, esse composto reage com as quinonas de ácidos hidroxycinâmicos formando “adutos” de oxidação. Como os adutos formados não servem de substrato para a enzima PPO, a captura das *o*-quinonas realizada pela GSH pode ser uma maneira interessante de limitar o escurecimento do mosto (SINGLETON et al., 1985; CHEYNIER et al., 1986; CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET, 1989). Alguns destes adutos de oxidação já foram descritos na literatura, como o *2-S-glutathionyl trans-caftaric acid* (Figura 4), conhecido como GRP (Produto de Reação da Uva - *Grape Reaction Product*), originado na reação entre a glutatona e o ácido *trans*-caftárico. A oxidação da quinona do GRP em presença de excesso de glutatona dá origem ao GRP2 (*2,5-di-S-glutathionyl trans-caftaric acid*) (Figura 4) (CHEYNIER et al., 1986; CHEYNIER et al., 1990; SALGUES et al., 1986). A concentração de glutatona disponível no meio é o fator limitante para a formação destes adutos durante o processo de oxidação. Da mesma maneira que o ácido caftárico, o ácido cafeico também pode reagir com a glutatona, originando o *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid* e o *2,5-di-S-glutathionyl trans-caffeic acid* (Figura 4) (CHEYNIER et al., 1986).

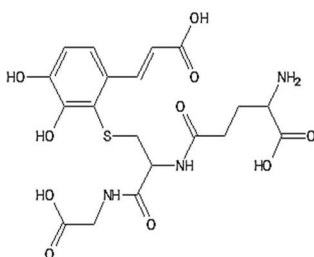
Figura 4 - Estrutura química dos principais adutos de oxidação.



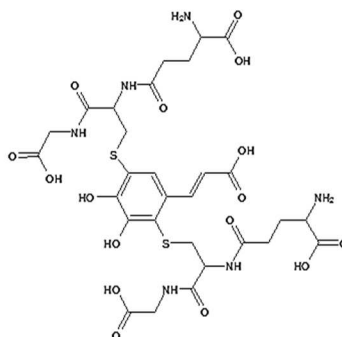
2-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid (GRP)



2,5-di-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid (GRP2)



2-S-glutathionyl *trans*-cafeic acid



2,5-di-S-glutathionyl *trans*-cafeic acid

O escurecimento de vinhos brancos ocorre devido às reações de oxidação enzimática e química. A oxidação enzimática ocorre principalmente durante a etapa de prensagem da uva e obtenção do mosto devido a ação da polifenoloxidase (PPO). Em vinhos a atividade da PPO é inibida pelo etanol, dessa forma o escurecimento durante o armazenamento de vinhos ocorre principalmente pela oxidação química, um processo mais lento do que a oxidação enzimática. A oxidação química está relacionada a três mecanismos: a oxidação dos compostos fenólicos à quinonas e consequentemente a polimerização. Esse mecanismo é catalisado por metais como ferro e cobre, que podem alterar a taxa de reação dependendo da sua concentração; oxidação do ácido tartárico à ácido glicoxílico, o qual leva a condensação dos compostos fenólicos agindo como uma “ponte” entre as moléculas fenólicas; e o

acetaldeído originado por oxidação acoplada ou durante a fermentação induzindo a condensação dos compostos fenólicos (CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003; ES-SAFI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 2003; DU TOIT et al., 2006).

Durante a oxidação, o O_2 é reduzido à $2H_2O_2$, o qual requer a adição de 4 elétrons, levando a formação dos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido (O_2^{2-}). Estes radicais são oxidantes mais potentes e podem ser diretamente reduzidos pelas moléculas fenólicas. Compostos fenólicos presentes nos vinhos podem existir tanto na forma fenol como fenolato devido à sua natureza ácida. A transferência de elétrons ocorre com a forma fenolato, levando a formação do radical livre semiquinona, o qual pode ser oxidado à quinona (DU TOIT et al., 2006).

A principal forma de prevenir o fenômeno de oxidação em vinhos brancos é a adição de dióxido de enxofre em diferentes etapas do processo de vinificação. Geralmente o dióxido de enxofre é utilizado em combinação com ácido ascórbico, que auxilia no sequestro do oxigênio antes da reação com os compostos fenólicos. Se o ácido ascórbico é utilizado sozinho, tanto o peróxido de hidrogênio como os produtos da degradação do ácido dehidroascórbico podem levar a formação de pigmentos de degradação (CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003; SONNI et al., 2011a).

Embora o dióxido de enxofre seja um eficiente agente de proteção da oxidação de vinhos brancos, alguns consumidores são sensíveis a esse antioxidante sintético, sendo necessária a aplicação de outros compostos, a glutatona se torna uma boa alternativa, pois esse composto está presente naturalmente no organismo (SONNI et al., 2011a). Em quantidades suficientes, a glutatona protege a cor de vinhos brancos durante o envelhecimento em garrafa onde prevalece a oxidação não enzimática, interrompendo a formação de polímeros, essa inibição é dependente da temperatura e da presença de metais como cobre ou ferro (SONNI et al., 2011a, 2011b). As reações de polimerização levam a formação de pigmentos de coloração escura conhecidos como cátion xantiliun que induzem a mudanças de cor negativamente relacionadas à qualidade do vinho branco. Esses pigmentos são formados a partir de compostos flavonóides, principalmente catequina (CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003).

2.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante é a capacidade de um composto em inibir a degradação oxidativa e a peroxidação lipídica. Os compostos fenólicos

são os principais antioxidantes em alimentos, destacando-se em vinhos. Embora a atividade antioxidante dos fenólicos seja associada a diversos mecanismos, esses compostos são altamente reativos com radicais livres, sendo considerado seu principal mecanismo de ação (ROGINSKY; LISSI, 2005). O consumo de vinho pode representar efeitos benéficos à saúde humana como inibição da peroxidação do LDL, prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares (FLANZY, 2000; JACKSON, 2008; GRIS et al., 2013).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos no vinho deve-se à mobilidade do oxigênio fenólico. A capacidade de reação polivalente dessas moléculas permite que ocorram múltiplas interações como formação de complexos com metais, combinação com moléculas nucleofílicas ou participação em reações redox. Essas propriedades são influenciadas por fatores como número e a localização de grupos hidroxilas na molécula, presença de substituintes *orto* ou *para*, estereoquímica, entre outros. Os compostos fenólicos podem atuar sobre o centro redox das cadeias de transporte de elétrons nos sistemas biológicos (FLANZY, 2000). Compostos fenólicos comumente encontrados em vinho branco como o ácido cafeico e *p*-cumárico, assim como flavonóis como a quercetina são bem conhecidos por apresentar potente atividade antioxidante (LEE; RENNAKER, 2007; JACKSON, 2008; ROUSSIS et al., 2008; XANTHOPOULOU et al., 2010). Em um estudo realizado por Goldberg et al. (1996), vinhos tintos e brancos apresentaram efeitos na modulação de lipídeos e lipoproteínas do plasma sanguíneo, concluindo que o vinho branco é tão eficiente quanto o vinho tinto para a redução do risco de doenças cardiovasculares.

Compostos como os polifenóis, os quais são facilmente oxidados, podem agir como bons antioxidantes. O grupo catecol (1,2 dihidroxi benzeno) reage rapidamente com oxidantes na forma de radical livre originando um radical muito estável. Os compostos com o grupo catecol ou 1,4 dihidroquinona são especialmente susceptíveis à oxidação, pois o radical fenoxil resultante pode ser estabilizado pelo anion oxigênio adjacente. O vinho branco é rico em substâncias com esses grupos, garantindo uma atividade antioxidante natural (WATERHOUSE, 2002).

Compostos antioxidantes como os compostos fenólicos presentes no vinho podem proteger o corpo humano do efeito de radicais livres e da peroxidação lipídica, além de retardar o progresso de diversas doenças crônicas. A habilidade de um composto fenólico em agir como um antioxidante depende das propriedades redox dos seus grupos hidroxilas presentes na sua molécula e da mobilidade de elétrons na sua estrutura química. A capacidade de sequestrar radicais livres dos compostos

fenólicos é muito importante devido ao efeito deletério que esses radicais causam nos sistemas biológicos (GÜLÇİN, 2010).

Trabalhos mostram que além de vinhos tintos, variedades de vinhos brancos possuem comprovada atividade antioxidante, aumentando a capacidade antioxidante no plasma (PSARRA et al., 2002; FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2004; QUIRÓS; LAGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009; PINZANI et al., 2010). Um estudo realizado por Pinzani et al. (2010) comparando a atividade antioxidante do plasma, de vinhos tintos e brancos indica que a ingestão de vinho branco foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante no plasma mais rapidamente do que o vinho tinto.

A atividade antioxidante pode ser medida através do monitoramento da inibição da oxidação de um substrato sensível. Após a oxidação do substrato sob condições padrões, a extensão da oxidação é medida por métodos químicos, sensoriais ou instrumentais. Os métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante incluem a capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC), poder de redução como FRAP, poder em sequestrar radicais livres como ABTS• e DPPH• e inibição da peroxidação lipídica como TBARS. Esses métodos diferem nos princípios dos testes e nas condições experimentais. Como se trata de várias reações e mecanismos, um único teste não reflete toda a capacidade antioxidante de um sistema. Dessa forma, para determinar um perfil completo da atividade antioxidante, diversos testes são necessários (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; LI, et al., 2009).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada diretamente com a sua estrutura química, a contribuição de cada polifenol individual para a atividade antioxidante do vinho é diferente, dessa maneira a atividade antioxidante depende fundamentalmente do todo o seu perfil fenólico e do sinergismo que existe entre esses compostos em vinhos (QUIRÓS; LAGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009). O modo específico de ação para a atividade antioxidante dos compostos fenólicos ainda não é claro, mas sabe-se que estes podem agir no seqüestro de radicais livres, quelação de metais e na regeneração de tocoferol (MAKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006).

REFERÊNCIAS

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-colored polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, v. 43, p. 805-813, 2010.

ANDUJAR-ORTIZ, I.; POZO-BAYÓN, M.A.; MORENO-ARRIBAS, M.V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RODRÍGUEZ-BENCOMO, J.J.; Reversed-phase high performance liquid chromatography – Fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor γ -Glutamyl cysteine in wines and model wines supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Analytical Methods*, v. 5, p. 154-161, 2012.

ARELLANO, M.; ANDRIANARY, J.; DEDIEU, F.; COUDERC, F.; PUIG, P. Method development and validation for simultaneous determination of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 765, p. 321-328, 1997.

BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 2788-2798, 2001.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, p. 317-333, 1998.

CAMERA, E.; PICARDO, M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*, v. 781, p. 181-206, 2002.

CARMEL-HAREL, O.; STORZ, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 439-461, 2000.

CLARK, A. C.; PRENZLER, P. D.; SCOLLARY, G. R. The role of copper (II) in the bridging reactions of (+)-catechin by glyoxylic acid in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6204-6210, 2003.

CLARK, A. C.; SCOLLARY, G. R. Influence of light exposure, ethanol and copper (II) on the formation of a precursor for xanthylum cations from tartaric acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 9, p. 64-71, 2003

CLARKE, R. J.; BAKKER, J. *Wine Flavor Chemistry*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2004.

CHEYNIER, V.; RIGAUD, J.; MOUTOUNET, M. Oxidation kinetics of *trans*-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. *Phytochemistry*, v. 29, p. 1751-1753, 1990.

CHEYNIER, V.; RIGAUD, J.; SOUQUET, J. M.; DUPRAT, F.; MOUTOUNET, M. Must Browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 41, p. 346-349, 1990.

CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.M.; MOUTOUNET, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 40, p. 320-324, 1989.

CILLIERS, J. J. L.; SINGLETON, V. L. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, p. 890-896, 1989.

CUTZACH, I.; CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D. Influence of storage conditions on the formation of some volatile compounds in white fortified wines (*Vins doux Naturels*) during the aging process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 2340-2345, 2000.

DARIAS-MRATÍN, J.; DÍAZ-GONZÁLEZ, D.; DÍAZ-ROMERO, C. Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *Journal of Food Engineering*, v. 63, p. 335-340, 2004.

DARIAS-MARTÍN, J. J.; RODRÍGUEZ, O.; DÍAZ, E.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, v. 71 p. 483-487, 2000.

DI LECCE, G.; BOSELLI, E.; D'IGNAZI, G.; FREGA, N. G. Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 53, 54-60, 2013.

DU TOIT, W.J.; LISJAK, K.; STANDER, M.; PREVOO, D. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, 2765-2769, 2007.

DU TOIT, W.J.; MARAIS, J.; PRETORIUS, I.S.; DU TOIT, M. Oxygen in must and wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v. 27, p. 76-94, 2006.

FAHEY, R.C. Novel thiols of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, p. 333-356, 2001.

FEIJÓO, O.; MORENO, A.; FALQUÉ, E. Content of *trans*- and *cis*-resveratrol in Galician white and red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 608-613, 2008.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLANO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, v. 513, p.113–118, 2004.

FLANZY, C. *Enología: Fundamentos Científicos Y Tecnológicos*. Madrid, Spain, 2000.

FRACASSETTI, D.; LAWRENCE, N.; TREDoux, A. G. J.; TIRELLI, A.; NIEUWOUDT, H. H.; TOIT, W. J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*, v.128, p.1136-1142, 2011.

FULCRAND, H.; DUEÑAS, M.; SALAS, E.; CHEYNIER, V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 57, p. 289-297, 2006.

GARDE-CERDÁN, T.; MARSELLÉS-FONTANET, A. R.; ARIAS-GIL, M.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, p. 469-476, 2008.

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I. A.; SPANOS, M.. *trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white varieties. *Food Control*, v. 17, p. 700-706, 2006.

GOLDBERG, D. M.; GAROVIC-KOCIC, V.; DIAMANDIS, E. P.; PACE-ASCIAC, C. R. Wine: does the colour count? *Clinica Chimica Acta*, v. 246, p. 183-193, 1996.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J.; GOZÁLEZ-MIRET, M. L.; HERNANZ, D.; FERNÁNDEZ, M. A.; VICARIO, I.; HEREDIA, F. J. Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 238-245, 2007.

GRIS, E.F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E.A.; VRHOVSEKE, U.; FILHO, D.W.; PEDROSA, R.C.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on *in vivo* antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 31, p. 31-40, 2013.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 210-218, 2010.

HERNANZ, D.; GALLO, V.; RECAMALES, A. F.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*, v. 113, p. 530-537, 2009.

JACKSON, R. S. Wine Science – Principles and Applications. London, UK. 3ed. *Academic Press*, 2008, 789p.

JACKSON, D. I.; LOMBARD, P. B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 44, p. 409-430, 1993.

JANEŠ, L.; LISJAK, K.; VANZO, A. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 674, p. 239-242, 2010.

KERRIDGE, G; ANTCLIFF, A. Wine grape varieties. Collingwood, Austrália. Revised Edition. *CSIRO Publishing*, 1999, 205p.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; WATERHOUSE, A. L.; TORRE-BORONA, M. C. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and Piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 281-283, 1995.

LAVIGNE, V.; PONS, A.; DUBOURDIEU, D. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A*, v. 1139, p. 130-135, 2007.

LEE, J.; RENNAKER, C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*, v. 105, p. 195-203, 2007.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, v. 112, p. 454-460, 2009.

LIBERATORE, M. T.; PATI, S.; NOBILE, M. A. D.; NOTTE, E. L. Aroma quality improvement of Chardonnay White wine by fermentation and ageing in barrique on lees. *Food Research International*, v. 43, p.996-1002, 2010.

- LIYANAGE, C.; ADAMS, D.O. Glutathione content of grape leaves and berries at onset of ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 43, p. 304, 1992.
- MAGGU, M.; WINZ, R.; KILMARTIN, P.A.; TROUGHT, M.C.T.; NICOLAU, L. Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 10281-10288, 2007.
- MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 396–404, 2006.
- MAKRIS, D. P.; PSARRA, E.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, v.36, p. 805-814, 2003.
- MARCHAND, S.; REVEL, G. A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. *Analytica Chimica Acta*, v. 660, p.158-163, 2010.
- MATO, I.; SUARÉZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, v. 88, p. 1175-1188, 2005.
- MATO, I.; SUARÉZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*, v. 102, p. 104-112, 2007.
- MATTIVI, F.; FEDRIZZI, B.; ZENATO, A.; TIEFENTHALER, P.; TEMPESTA, S.; PERENZONI, D.; CATARELLA, P.; SIMEONI, F.; VRHOVSEKA, U. Development of reliable analytical tools for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. *Analytica Chimica Acta*, v. 732, p. 194-202, 2012.
- MEISTER, A. Glutathione, Ascorbate, and Cellular Protection. *Cancer Research*, v. 54, p. 1969 – 1975, 1994.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Science, New York, USA, 2009.

OSZMIANSKI, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 1712-1715, 1996.

PARK, S. K.; BOULTON, R.B.; NOBLE, A.C. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chemistry*, v. 68, p. 475-480, 2000.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, v. 333, p. 19-39, 2003.

PATEL, P.; HERBST-JOHNSTONE, M.; LEE, S.A.; GARDNER, R.C.; WEAVER, R.; NICOLAU, L.; KILMARTIN, P.A. Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 7280-7288, 2010.

PEÑA-NEIRA, A.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA-VALLEJO, C.; ESTRELLA, I.; SUAREZ, J.A. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology*, v. 210, p. 445-448, 2000.

PENNINCKX, M.J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, v. 2, p. 295-305, 2002.

PINZANI, P.; PETRUZZI, E.; MAGNOLFI, S. U.; MALENTACCHI, F.; DE SIENA, G.; PETRUZZI, I.; MOTTA, M.; MALAGUARNERA, M.; MARCHIONNI, N.; PAZZAGLI, M. Red or white wine assumption and serum antioxidant capacity. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 51, p. 72-74, 2010.

POZO-BAYÓN, M.A.; ANDÚJAR-ORTIZ, I.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, v. 42, p. 754-761, 2009.

PRIPIS-NICOLAU, L.; REVEL, G.; MARCHAND, S.; BELOQUI, A.A.; BERTRAND, A. Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in musts and wines; first applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, p.731-738, 2001.

PSARRA, E.; MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 82, p. 1014-1020, 2002.

QUIRÓS, A. R. B.; LAGE-YUSTY, M. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, v. 42, p. 1018-1022, 2009.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. Handbook of Enology– vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. *Wiley & Sons*, West Sussex, UK, 2006a.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Handbook of Enology – vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. *Wiley & Sons*, West Sussex, UK, 2006b.

ROBICHAUD, J.L.; NOBLE, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 53, p. 343-353, 1990.

RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE, R.; PECES, R.R.; VOZMEDIANO, J.L.C.; GASCUEÑA, J.M.; ROMERO, E.G. Phenolic compounds in skin and seeds of ten grape *Vitis vinifera* grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 687-693, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROUSSIS, I. G.; LAMBROPOULOS, I.; TZIMAS, P.; GKOU LIOTI, A.; MARINOS, V.; TSOUPEIS, D.; BOUTARIS, I. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 614-621, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, v. 8, p. 121-137, 2002.

SANDLER, M.; PINDER, R.; *Wine: A scientific exploration*. London, UK. Taylor & Francis, 2003, 336p.

SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; ERTEN, H.; LEPOUTRE, J.; GUNATA, Z. Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv Narince. *Food Control*, v. 17, p. 75-82, 2006.

SINGLETON, V. L.; SALGUES, M.; ZAYA, J.; TROUSDALE, E. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 36, p. 50-56, 1985.

SKELTON, Stephen. Site selection. In: SKELTON, Stephen. *Viticulture: An introduction to commercial grape growing for wine production*. Londres: Lulu, 2007. Cap. 3, p. 47-61.

SONNI, F.; CLARK, A.C.; PRENZLER, P.D.; RIPONI, C.; SCOLLARY, G.R. Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 3940-3949, 2011a.

SONNI, F.; MOORE, E.G.; CLARK, A.C.; CHINNICI, F.; RIPONI, C.; SCOLLARY, G.R. Impact of glutathione on the formation of methylmethine- and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimmers in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 7410-7418, 2011b.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 1253-1257, 1996.

UGLIANO, M.; KWIATKOWSKI, M.; VIDAL, S.; CAPONE, D.; SIEBERT, T. DIEVAL, J.B.; AAGAARD, O.; WATERS, E.J.; Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methylmercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 2564-2572, 2011.

VILANOVA, M.; RODRÍGUEZ, I.; CANOSA, P.; OTERO, I.; GAMERO, E.; MORENO, D.; TALAVERANO, I.; VALDÉS, E. Variability in chemical composition of *Vitis vinifera* cv Mencía from different geographic areas and vintages in Ribeira Sacra (NW Spain). *Food Chemistry*, v. 169, p. 187-196, 2015.

VILANOVA, M.; SANTALLA, M.; MASA, A. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in grapes (*Vitis vinifera*) from northwest Spain. *Journal of Agricultural Science*, v. 147, p. 683-697, 2009.

VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier transform infrared detection for determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. *Journal of Chromatography A*, v. 824, p. 159-167, 1998.

XANTHOPOULOU, M. N.; FRAGOPOULOU, E.; KALATHARA, K.; NOMIKOS, T.; KARANTONIS, H. C.; ANTONOPOULOU, S. Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chemistry*, v. 120, p. 665-672, 2010.

WATERHOUSE, A. L. Wine Phenolics. In: *Annals New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, New York, USA, 2002.

CAPÍTULO 2

Impact of pressing conditions on the phenolic composition, radical scavenging activity and glutathione content of Brazilian *Vitis vinifera* white wines and evolution during bottle ageing

Nayla E. Ferreira-Lima, Vívian M. Burin, Vinicius Caliari, Marilde T. Bordignon-Luiz

Artigo publicado na revista *Food Bioprocess and Technology*, v. 9, p.944 – 957, 201

CAPÍTULO 3

Oxidação de vinhos brancos: Uso da glutathione na prevenção do escurecimento e o impacto na composição fenólica

Nayla E. Ferreira-Lima, Vivian M. Burin, Vinicius Caliar, Marilde T. Bordignon-Luiz

Resumo

Reações de oxidação são particularmente importantes quando relacionadas a vinhos brancos, essas reações envolvem compostos fenólicos, principalmente ácidos hidroxicinâmicos, e resultam em escurecimento de vinhos brancos durante a vida de prateleira. A fim de evitar o escurecimento oxidativo desses vinhos, diversas técnicas são empregadas nas etapas pré-fermentativas do vinho e no momento do engarrafamento. A glutathione é um importante agente antioxidante e pode ser encontrado naturalmente em uvas e vinhos. Estudos mostram que esse composto participa nas reações de escurecimento originando produtos de oxidação incolores, prevenindo o escurecimento em vinhos brancos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de glutathione (10 mgL⁻¹) em vinhos brancos antes do engarrafamento na composição química e no índice de escurecimento desses vinhos durante 8 meses de armazenamento em garrafa. Os vinhos foram analisados quanto aos parâmetros enológicos clássicos, polifenóis totais, *o*-difenóis, flavanóis totais e atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH e índice de escurecimento por espectrofotometria e compostos fenólicos individuais e glutathione por cromatografia líquida de alta eficiência. Durante o tempo de armazenamento em garrafa foi observado que as amostras de vinhos com adição de glutathione apresentaram maiores concentrações de polifenóis totais e individuais, bem como *o*-difenóis e flavanóis totais. A atividade antioxidante aumentou durante o armazenamento, e as amostras com adição de glutathione apresentaram maior poder de sequestro de radicais livres do que as amostras controle. O índice de escurecimento durante o tempo de guarda foi menor em amostras com adição de glutathione, indicando a importância da glutathione em prevenir a oxidação em vinhos. Correlações significativas foram encontradas entre a concentração de glutathione reduzida e polifenóis totais ($R=0,96$), ácido cafeico ($R=0,84$) e caftarico ($R=0,79$). Além disso uma importante correlação negativa foi encontrada entre a concentração de glutathione total e o escurecimento ($R=0,91$). Com a análise de componentes principais (ACP) foi possível observar a separação das amostras com

adição de glutatona e amostras controle, sendo que as amostras controle foram correlacionadas com o escurecimento.

1 INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são diretamente relacionados com atributos de qualidade dos vinhos, tais como cor e adstringência. Esses compostos são os principais constituintes dos vinhos e podem ser rapidamente oxidados formando pigmentos de coloração escura e afetando as características de cor, principalmente no caso de vinhos brancos (SINGLETON et al., 1985).

O escurecimento de vinhos brancos é um dos maiores problemas para a indústria de vinhos, resultando em perdas econômicas. No mosto, os compostos fenólicos, especialmente ácidos hidroxicinâmicos, são importantes substratos nas reações de oxidação. Durante a vinificação, na etapa da prensagem esses ácidos cinâmicos são liberados das células das uvas para o mosto, e são rapidamente oxidados pela enzima polifenol oxidase (PPO), também presente no meio. Uma série de reações de oxidação são desencadeadas, formando quinonas polimerizadas (SINGLETON et al. 1985; CHEYNIER; SILVA, 1991).

A glutatona (GSH) é um tri-peptídeo que ocorre naturalmente em uvas, e consequentemente em mostos e vinhos, e sua concentração pode variar dependendo de diversos fatores como variedade de uva, práticas utilizadas na vinificação, condições do solo e de clima (CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET; 1989). Este composto participa diretamente no processo de oxidação, tendo importante papel de agente antioxidante pois é capaz de reagir com as *o*-quinonas dos ácidos hidroxicânicos, formando compostos conhecidos como “adutos” de oxidação, dentre os quais o *2-S-glutathionyl trans-caftaric acid* ou GRP (*Grape Reaction Product ou Produto de Reação da Uva*) foi o primeiro a ser totalmente elucidado (SINGLETON et al., 1985; CHEYNIER et al., 1986; CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET, 1989). Os compostos formados não possuem coloração e não servem de substrato para a enzima PPO, dessa forma limitando as reações de escurecimento. Como a glutatona é um composto naturalmente presente em diversas frutas e vegetais, sua adição em mostos e vinhos revela-se uma alternativa interessante para a prevenção da oxidação de vinhos brancos e evitar o escurecimento.

A adição de glutatona, em concentrações não maiores que 20 mgL⁻¹, em vinhos com intuito de prevenir a oxidação e preservar as características do aroma, foi recentemente adotada como prática enológica permitida pela OIV (Organisation Internationale de la Vigne et

duVin) em assembleia geral realizada na Alemanha em 2015 (OIV, 2015). A adição de glutathione em vinhos tem sido investigada principalmente quanto à proteção de aromas varietais e sulfurados (ROUSSIS; LAMBROPOULOS; TZIMAS, 2007; PATEL et al., 2010; UGLIANO et al., 2011), porém avaliar o efeito deste potente antioxidante na composição química de vinhos brancos ao longo do armazenamento é fundamental para que se possa traçar novas estratégias e desenvolver novas técnicas para produção de vinhos com alta qualidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de glutathione em vinhos brancos no momento do engarrafamento elaborados com variedades *Vitis vinifera* cultivadas no Estado de Santa Catarina ao longo de oito meses de tempo de guarda em garrafa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microvinificação

Os vinhos foram elaborados utilizando as variedades (*Vitis vinifera*) Sauvignon Blanc, Manzonni e Garganega, cultivadas na Região de Videira, Santa Catarina, na safra 2013. As uvas foram colhidas em seu ponto ótimo de maturação, desengaçadas e transferidas para uma prensa hidropneumática (Enoveneta – Hidroprensa80). Posteriormente, as uvas foram transferidas para tanques de fermentação, foi adicionado SO₂ (40 mgL⁻¹) na forma de metabisulfito, enzimas pectinolíticas (Endozym ICS 10 Arome) e solução de bentonite 10 % v/v (7 mL L⁻¹) como agente clarificante.

A microvinificação foi realizada logo após o processo de clarificação e sedimentação estática em câmara fria. Cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (20 g 100 Kg⁻¹) (Fermol Blanc, AEB Group) foram adicionadas ao mosto para início da fermentação alcoólica, a temperatura foi mantida a 17 °C. Os vinhos experimentais foram estabilizados em câmara fria por 30 dias e adicionados de SO₂ livre (40 mgL⁻¹) (Noxitan, AEB), posteriormente foram realizadas trasfega e filtração. Antes do engarrafamento, glutathione reduzida (10 mgL⁻¹) foi adicionada às amostras de vinhos, com exceção das amostras controle (sem adição da glutathione). Os vinhos foram engarrafados em garrafas de vidro verde escuro clássico com rolhas de cortiça, e mantidas na posição horizontal sob temperaturas controladas (4°C) até o momento das análises.

Todo o processo de vinificação foi realizado na estação experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina) na cidade de Videira/SC.

As garrafas de vinhos foram analisadas após três meses de armazenamento (T0) e em intervalos de dois meses ao longo de oito meses de guarda. Para cada tempo (T) as garrafas foram abertas no momento das análises.

2.2 Reagentes Químicos

Os reagentes utilizados na realização das análises como acetonitrila e metanol foram de grau cromatográfico. O ácido acético, ácido tartárico e demais reagentes foram de grau analítico. A água utilizada para as análises foi obtida através de sistema de purificação Milli-Q, (Millipore, Massachusetts, USA). Todos os solventes utilizados como fase móvel foram previamente filtrados em membrana com poros de 0,45 μm (Millipore) e degaseificados antes do uso.

Os padrões catequina, epicatequina, ácidos gálico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, *trans*-caftárico, vanílico, siríngico, protocateico, elágico, tirosol, *trans*-resveratrol, quercetina, miricetina e campferol foram obtidos na Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Todos os reagentes apresentaram pureza maior do que 95 %.

As soluções estoque de cada padrão (1 g L^{-1}) foram preparadas em metanol e acondicionadas ao abrigo da luz em temperatura de refrigeração (4 °C). Uma solução contendo uma mistura de todos os padrões foi preparada em sistema de vinho sintético (solução hidroalcoólica 5 g L^{-1} , ácido tartárico 12 % v/v de etanol e pH 3,2). O vinho sintético foi utilizado para evitar interferência na separação cromatográfica e na resposta de detecção. As soluções de trabalho e de calibração foram preparadas também em vinho sintético pela diluição da solução estoque contendo a mistura dos padrões. Todas as soluções de trabalho foram estocadas ao abrigo da luz sob temperatura de refrigeração (4 °C).

2.3 Métodos

Parâmetros enológicos clássicos

As análises físico-químicas clássicas realizadas de acordo com a OIV (2012). Foram realizadas análises de pH (pH meter 220 MP Mettler-Toledo), acidez total titulável (ATT) (g ácido tartárico L^{-1}), acidez volátil

(g ácido acético L⁻¹), teor alcoólico (Ebuliometria), SO₂ total e livre (mgL⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Análises Espectrofotométricas

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi U 2010, CA, USA) quanto à concentração de polifenóis totais (PT), *o*-difenóis, flavanóis totais e atividade antioxidante *in vitro* (DPPH). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação de polifenóis totais (PT)

A concentração de polifenóis totais foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com leituras da absorbância em 760 nm. Os resultados do total de polifenóis foram expressos em mg de ácido gálico (GAE) L⁻¹ (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Determinação dos o-difenóis (reação de Arnow)

A determinação dos *o*-difenóis foi realizada de acordo com Flanzky e Aubert (1969), utilizando o reativo de Arnow e formação de complexo do molibdeno, presente no reativo, com os compostos *orto*-, *di*- e *tri*-fenóis presente no vinho. A leitura da absorbância foi realizada em 500 nm. O resultado obtido foi expresso em mg de catequinaL⁻¹.

Flavanóis Totais

Os flavanóis totais foram determinados utilizando o método colorimétrico DMACA (4-dimetilaminocinamaldeído) descrito por Arnous, Makris e Kefalas (2001). Após a reação das amostras com o reativo DMACA foi realizada leitura da absorbância em comprimento de onda de 640 nm. O resultado foi expresso em catequina mgL⁻¹.

Atividade Antioxidante “in vitro” - Método DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

A atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos foi avaliada utilizando o método DPPH, de acordo com Kim et al. (2002). Esse método avalia o poder de sequestro do radical DPPH[•] pela amostra de vinho. As leituras de absorbância foram realizadas antes e após a adição da amostra de vinho ao radical DPPH[•] em 517nm. Os resultados foram expressos em equivalente ao Trolox (TEAC) (μM).

Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um equipamento de cromatografia líquida Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com degaseificador a vácuo (DGU-20A₅), sistema quaternário de bombas (LC-20AT), detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e detector de Fluorescência (RF-10Axi), forno (CTO-20A) e injetor manual com capacidade de 20 µL. O software utilizado para controlar o sistema gradiente, o detector DAD, detector de fluorescência e para aquisição dos dados foi *LC Solution*, com comunicador modelo CBM-20A. A fase estacionária era composta de uma coluna em fase reversa C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm de tamanho de partícula) Shimadzu (Kyoto, Japan). Para anteceder a coluna analítica foi utilizada uma coluna de guarda C18 (4,6 mm x 12,5 mm, 5 µm de tamanho de partícula) (Shimadzu, Japan), a fim de evitar que resíduos não solúveis da amostra contaminassem a coluna. A temperatura ambiente foi controlada e mantida em 20±1 °C. As análises cromatográficas foram realizadas em triplicata.

Determinação de compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos individuais, as amostras de vinhos foram submetidas à extração líquido-líquido de acordo com método descrito por Burin et al. (2014). A amostra (5 mL) foi extraída com duas extrações sucessivas utilizando acetato de etila (10 mL) durante 3 minutos. Após a extração, as fases orgânicas foram evaporadas em rota-evaporador. Para injeção no sistema cromatográfico, as amostras secas foram ressuspensas em solução de metanol:água (1:1 v/v) e filtradas em membrana PTFE de 0,45 µm.

Os ácidos hidroxibenzoicos (ácidos gálico, protocateico, vanílico, siríngico e elágico) foram determinados utilizando o método descrito por Burin et al. (2014). Como solvente para fase móvel A foi utilizado H₂O:CH₃COOH (98:2 v/v) e solvente para a fase móvel B foi composto de 20 % do solvente A e 80 % de CH₃CN. Os compostos fenólicos foram eluídos utilizando um gradiente linear: 0-30 % solvente B por 35 minutos, de 30-60 % de B por 5 minutos, 60 % de B durante 2 minutos, 60-0 % B por 5 minutos e 0 % B por 3 minutos para acondicionamento da coluna. O fluxo utilizado foi 1,2 mLmin⁻¹. Os compostos foram quantificados em 280nm.

Os demais compostos fenólicos (tirosol, catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-caftárico,

campferol, miricetina, quercetina e *trans*-resveratrol) foram quantificados de acordo com Burinet al. (2014) com modificações. Como solvente para fase móvel A utilizou-se H₂O:CH₃COOH (98:2 v/v) e como solvente para fase móvel B H₂O:CH₃COOH:CH₃CN (58:2:40 v/v/v). As condições do gradiente de eluição foram: 0-80 % solvente B por 55 minutos, de 80-100 % de B por 15 minutos, retornando em 0 % de solvente B durante 5 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,90 mLmin⁻¹. A quantificação dos compostos tirosol, catequina e epicatequina foi realizada em 280 nm, compostos da classe dos ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, caftarico, *p*-cumárico e ferúlico) foram quantificados em 320 nm, os compostos flavonóis (miricetina, quercetina e campferol) foram quantificados em 360 nm e o *trans*-resveratrol foi quantificado em 306 nm.

Determinação da glutathione total, oxidada e reduzida

A concentração de glutathione total, oxidada e reduzida foi determinada de acordo com método descrito por Ferreira-Lima et al. (2016). A quantificação da GSH e GSSG foi realizada em detector de fluorescência, os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 467 e 525 nm respectivamente. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 8,6) (fase móvel A) e metanol (fase móvel B). Os analitos foram eluídos em condição isocrática: 85 % solvente A e 15 % solvente B por 15 minutos, com fluxo de 1,0 mLmin⁻¹. Para quantificação da glutathione (GSH) em detector de fluorescência, 100 µL de amostra de vinho foi adicionada à 900 µL de tampão fosfato (0,01 mM, pH 7,4) e em seguida realizou-se uma reação de derivatização pré-coluna com naftaleno 2,3-dicarboxialdeído (NDA) (1 mgmL⁻¹) e tampão borato (pH 9,2) após 4 minutos de reação a amostra foi injetada no cromatógrafo com forno mantido à temperatura de 40 °C durante toda análise.

Para quantificação da glutathione total (GSH total), antes de se realizar a reação de derivatização com NDA, foi realizada uma reação de redução da glutathione oxidada (GSSG), utilizando-se tris (2-carboxietil) fosfana (TCEP) (0,35 mM), após 3 minutos de reação a amostra foi derivatizada com NDA conforme descrito anteriormente e injetada diretamente no cromatógrafo. A concentração de glutathione oxidada foi determinada utilizando o cálculo das concentrações de glutathione total e reduzida (FERREIRA-LIMA et al., 2016).

Índice de Escurecimento

O índice de escurecimento foi determinado para as amostras de vinhos durante o tempo de guarda, utilizando as medidas diretas de absorbância das amostras de vinhos brancos em 420 nm em cubeta de quartzo (10mm) utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi U 2010, CA, USA) (LERMA et al., 2010).

Análise Estatística

O programa Statistica versão 8.0 (2007) (Statsoft, Inc. Tulsa, OK) foi utilizado para realizar as análises de variância (ANOVA), cálculo dos valores médios, desvio padrão, teste TUKEY HSD ($p < 0,05$) e análise de correlação dos resultados obtidos. A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para avaliar a influência da adição de glutathione em vinhos brancos na composição química desses vinhos e índice de escurecimento durante o tempo de guarda em garrafa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros Enológicos

Os resultados de parâmetros enológicos clássicos para as amostras de vinhos adicionadas de glutathione e amostras controle estão apresentados na Tabela 1. Poucas amostras apresentaram diferenças significativas comparando amostras controle com as adicionadas de glutathione. O que está de acordo com outros trabalhos como o reportado por Patel e colaboradores (2010) em que foi observado que a adição de glutathione não afetou significativamente os parâmetros enológicos dos vinhos. Os valores encontrados estão de acordo com o preconizado pela legislação brasileira para vinhos brancos (BRASIL, 1988).

Tabela 1- Parâmetros enológicos clássicos de vinhos brancos Sauvignon blanc (SB), Manzoni (MZ) e Garganega (GG) adicionados de GSH 10 mgL⁻¹ e amostras controle.

Amostras	pH	ATT	Acidez Volátil	SO ₂		Teor Alcoólico (%)
				Total	Livre	
SBcontrole	3,17 ^a ±0,01	1,65 ^a ±0,03	0,16 ^a ±0,01	87,20 ^a ±2,88	8,27 ^a ±0,46	12,50 ^a ±0,01
SBGSH	3,09 ^b ±0,01	1,66 ^a ±0,02	0,13 ^b ±0,01	94,13 ^b ±3,03	7,47 ^a ±0,92	12,20 ^b ±0,01
MZcontrole	3,09 ^a ±0,01	1,54 ^a ±0,02	0,16 ^a ±0,01	64,00 ^a ±3,20	7,73 ^a ±0,50	12,50 ^a ±0,11
MZGSH	3,10 ^a ±0,01	1,55 ^a ±0,01	0,15 ^a ±0,01	60,27 ^a ±0,46	6,93 ^a ±0,92	12,70 ^a ±0,10
GGcontrole	3,02 ^a ±0,01	1,77 ^a ±0,01	0,14 ^a ±0,01	49,60 ^a ±0,01	9,60 ^a ±0,80	11,60 ^a ±0,10
GGGSH	3,04 ^a ±0,01	1,74 ^a ±0,02	0,15 ^a ±0,01	92,80 ^b ±3,20	10,80 ^a ±0,40	11,50 ^a ±0,11

ATT: Acidez total titulável (g de ácido tartárico/ L vinho); Acidez volátil (g de ácido acético L⁻¹ vinho); SO₂ (mgL⁻¹ vinho). Valores não distribuídos com mesma letra (coluna) entre as amostras são significativamente diferentes (p≤0,05) (teste de Tukey).

3.2 Análises Espectrofotométricas

Os valores para as concentrações de polifenóis totais, *o*-difenóis, flavanóis totais e atividade antioxidante (DPPH) das amostras, armazenadas durante 8 meses em garrafa, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises espectrofotométricas de vinhos Sauvignon blanc (SB), Manzoni (MZ) e Garganega (GG) adicionados de glutatona (GSH) 10 mgL⁻¹ e amostras controle durante 8 meses de guarda em garrafa.

<i>Polifenóis Totais</i>	Sauvignon Blanc		Manzoni		Garganega	
	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>
T0	240,00±9,00	236,00±6,00	285,50±7,51	285,00±1,00	294,50±2,50	292,00±1,00
T2	221,27±2,30	230,36±1,45	258,55±2,15	289,46±5,30	269,45±2,66	297,64±5,88
T4	214,00±2,85	227,64±3,12	252,18±3,00	282,18±2,31	268,55±1,97	294,00±2,93
T6	212,18±2,78	225,82±4,03	254,00±1,74	283,09±4,00	266,73±1,82	293,09±6,25
T8	207,64±3,94	222,18±2,58	251,27±2,35	281,27±3,04	251,27±3,48	291,27±3,00
<i>O-difenóis</i>						
T0	28,06±0,25	30,54±0,50	54,47±0,12	52,82±0,90	70,57±1,51	68,50±1,01
T2	36,32±0,98	37,14±0,86	44,57±0,85	48,53±1,23	66,85±0,50	74,28±1,89
T4	30,54±0,80	33,84±0,34	42,09±1,11	46,22±2,01	51,17±1,00	70,65±2,01
T6	31,09±1,02	34,25±1,65	45,18±0,93	46,72±0,31	63,18±0,36	66,85±1,13
T8	34,25±0,22	35,50±0,47	47,05±1,26	46,83±0,26	70,16±0,78	72,48±1,47

Continuação

<i>FlavanóisTotais</i>						
T0	6,44 ^a ±0,05	6,78 ^b ±0,11	5,87 ^a ±0,13	5,65 ^b ±0,02	10,35 ^a ±0,11	9,78 ^b ±0,09
T2	5,59 ^a ±0,13	5,97 ^b ±0,17	4,62 ^a ±0,11	4,79 ^a ±0,18	7,57 ^a ±0,22	8,17 ^b ±0,26
T4	6,14 ^a ±0,30	6,94 ^b ±0,16	5,63 ^a ±0,04	5,55 ^a ±0,13	9,73 ^a ±0,16	9,68 ^a ±0,33
T6	5,92 ^a ±0,47	6,59 ^b ±0,22	5,42 ^a ±0,09	5,46 ^a ±0,17	8,80 ^a ±0,07	9,40 ^b ±0,27
T8	5,18 ^a ±0,12	6,44 ^b ±0,20	5,21 ^a ±0,10	5,35 ^a ±0,15	8,00 ^a ±0,13	9,17 ^b ±0,24
<i>AA DPPH</i>						
T0	447,20 ^a ±9,80	410,35 ^b ±6,84	480,98 ^a ±3,69	523,08 ^b ±8,30	632,73 ^a ±3,89	628,75 ^b ±2,75
T2	495,45 ^a ±3,13	502,90 ^b ±2,17	691,05 ^a ±3,02	684,70 ^b ±2,11	804,45 ^a ±5,33	856,45 ^b ±7,06
T4	525,13 ^a ±5,70	653,33 ^b ±7,89	695,45 ^a ±4,08	712,10 ^b ±3,76	862,98 ^a ±7,12	889,73 ^b ±6,23
T6	495,88 ^a ±6,43	555,33 ^b ±9,12	632,25 ^a ±9,14	731,45 ^b ±7,43	873,08 ^a ±5,77	842,90 ^b ±8,01
T8	507,25 ^a ±6,04	558,38 ^b ±8,29	603,40 ^a ±8,88	686,45 ^b ±5,79	825,43 ^a ±4,02	863,00 ^b ±5,13

PolifenóisTotais (mgL⁻¹ de ácido gálico); *O*-difenóis (mgL⁻¹de catequina); FlavanóisTotais (mgL⁻¹ de catequina); AA (atividade antioxidante): equivalente ao Trolox (TEAC)(μM). T0: tempo zero; T2: dois meses de envelhecimento; T4: quatro meses de envelhecimento; T6: seis meses de envelhecimento; T8: oito meses de envelhecimento. Valores não distribuídos com mesma letra (linha) entre uma mesma variedade são significativamente diferentes (p≤0,05) (teste de Tukey).

Como pode ser observado, de forma geral, as amostras adicionadas de glutathione apresentaram maior concentração de polifenóis totais, *o*-difenóis e flavanóis totais durante o tempo de armazenamento, indicando uma possível ação da glutathione na proteção desses compostos frente à oxidação. Compostos fenólicos *o*-difenóis são os principais envolvidos nas reações de oxidação que ocorrem nos vinhos ao longo do tempo de guarda, pois a posição *ortho* dos grupamentos hidroxila (OH) confere uma alta estabilidade ao radical formado e participa no deslocamento de elétrons (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Foi possível observar que durante o tempo de guarda em garrafa, amostras com adição de glutathione apresentaram diminuição na concentração de compostos fenólicos, para as amostras controle (sem adição de glutathione) a diminuição da concentração de polifenóis totais foi maior quando comparada com a concentração inicial (T0). Maior concentração de polifenóis em vinhos com adição de glutathione também foi observada por Hosry e colaboradores (2009) em vinhos da variedade Chardonnay. Durante envelhecimento, os compostos fenólicos presentes em vinhos participam de diversas reações, como por exemplo reações de oxidação, afetando a composição final desses vinhos (HERNANZ et al., 2009). Dentre as três variedades avaliadas, vinhos elaborados com a variedade Garganega apresentaram maior concentração de polifenóis totais.

A maior concentração de polifenóis totais encontrada para as amostras com adição de glutathione durante o armazenamento pode estar relacionada com a redução das quinonas à sua forma fenólica inicial. Tanto a cisteína quanto a glutathione, quando adicionadas em vinhos, podem agir regenerando fenóis oxidáveis através da redução das quinonas formadas durante as reações de oxidação à sua forma fenólica inicial (DU TOIT et al., 2006).

O método DPPH é uma medida geral do poder de sequestro de radicais livres de uma amostra (BAIANO et al., 2012). Os resultados de atividade antioxidante *in vitro* para as amostras de vinhos estão apresentados na Tabela 2. Como pode ser observado, amostras adicionadas de glutathione apresentaram maior atividade antioxidante que as amostras controle. Além dos compostos fenólicos, a glutathione também possui atividade antioxidante utilizando de diferentes mecanismos, inclusive reações envolvendo as espécies reativas de oxigênio (ROS) (PENNINCKX 2002). Vinhos elaborados com a variedade Garganega apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante *in vitro*, o que pode estar correlacionado com a alta concentração de compostos fenólicos.

3.3 Análises Cromatográficas

Compostos fenólicos

As concentrações de compostos fenólicos individuais em amostras adicionadas de glutathione e controle durante o tempo de guarda em garrafa estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4. As concentrações de compostos fenólicos individuais nos vinhos apresentaram diferentes perfis de acordo com a variedade de uva com que foi elaborado. O ácido caftarico e o tirosol foram os compostos fenólicos que apresentaram maiores concentrações em todas as amostras de vinhos, com ou sem a adição de glutathione.

Tabela 3 - Compostos fenólicos individuais (mgL⁻¹) em vinhos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionados de glutathiona (GSH) 10 mgL⁻¹ e amostras controle ao longo de 8 meses de tempo de guarda em garrafa.

<i>Sauvignonblanc</i>	Catequina	Epicatequina	Tirosol	Quercetina	Resveratrol
<i>Controle</i>					
T0	0,63 ^a ±0,01	7,99 ^a ±0,03	27,77 ^a ±0,02	2,00 ^a ±0,02	0,35 ^a ±0,01
T2	0,85 ^b ±0,03	4,84 ^a ±0,02	29,34 ^a ±0,08	2,00 ^a ±0,01	0,42 ^a ±0,02
T4	0,57 ^a ±0,01	4,93 ^a ±0,01	30,31 ^a ±0,13	2,01 ^a ±0,01	0,41 ^a ±0,01
T6	0,79 ^a ±0,02	4,94 ^a ±0,03	29,27 ^a ±0,05	2,01 ^a ±0,02	0,44 ^a ±0,01
T8	0,49 ^a ±0,01	5,03 ^a ±0,01	31,46 ^a ±0,04	2,02 ^a ±0,01	0,44 ^a ±0,02
<i>GSH</i>					
T0	0,67 ^b ±0,01	4,63 ^b ±0,02	26,14 ^b ±0,03	1,98 ^a ±0,01	0,34 ^a ±0,01
T2	0,93 ^b ±0,01	5,03 ^b ±0,05	30,49 ^b ±0,10	2,03 ^a ±0,03	0,42 ^a ±0,01
T4	0,83 ^b ±0,03	5,50 ^b ±0,05	30,21 ^a ±0,12	1,99 ^a ±0,01	0,42 ^a ±0,02
T6	0,74 ^a ±0,01	5,60 ^b ±0,03	29,44 ^b ±0,03	2,01 ^a ±0,01	0,49 ^b ±0,02
T8	0,60 ^b ±0,01	5,76 ^b ±0,06	31,17 ^b ±0,07	2,01 ^a ±0,02	0,43 ^a ±0,01
<i>Manzoni</i>					
<i>Controle</i>					
T0	0,75 ^a ±0,01	6,05 ^a ±0,02	37,90 ^a ±0,04	2,11 ^a ±0,01	0,39 ^a ±0,01
T2	0,77 ^a ±0,02	5,89 ^a ±0,05	42,73 ^a ±0,12	2,15 ^a ±0,01	0,40 ^a ±0,01
T4	0,73 ^a ±0,02	6,17 ^a ±0,01	47,19 ^a ±0,07	2,15 ^a ±0,02	0,42 ^a ±0,02
T6	0,84 ^a ±0,03	6,15 ^a ±0,02	41,03 ^a ±0,08	2,21 ^a ±0,01	0,43 ^a ±0,01
T8	0,88 ^a ±0,01	6,18 ^a ±0,01	43,25 ^a ±0,11	2,31 ^a ±0,02	0,47 ^a ±0,02
<i>GSH</i>					
T0	0,71 ^b ±0,01	5,53 ^b ±0,01	39,41 ^b ±0,03	2,13 ^a ±0,02	0,40 ^a ±0,01
T2	0,73 ^b ±0,01	5,47 ^b ±0,07	35,78 ^b ±0,15	2,11 ^b ±0,01	0,40 ^a ±0,02
T4	0,74 ^a ±0,03	5,64 ^b ±0,09	46,33 ^b ±0,10	2,24 ^b ±0,03	0,49 ^b ±0,01
T6	0,79 ^b ±0,01	5,84 ^b ±0,02	39,75 ^b ±0,11	2,13 ^b ±0,01	0,53 ^b ±0,03
T8	0,84 ^b ±0,02	5,89 ^b ±0,05	44,62 ^b ±0,07	2,20 ^b ±0,02	0,53 ^b ±0,02

continuação

<i>Garganega</i> <i>Contr</i> <i>ole</i>					
T0	0.48 ^a ±0.01	6.27 ^a ±0.02	30.08 ^a ±0.03	2.05 ^a ±0.01	0.41 ^a ±0.01
T2	0.67 ^a ±0.01	5.85 ^a ±0.04	26.10 ^a ±0.03	2.12 ^a ±0.01	0.43 ^a ±0.01
T4	0.72 ^a ±0.03	5.95 ^a ±0.03	30.38 ^a ±0.01	2.12 ^a ±0.02	0.43 ^a ±0.01
T6	0.75 ^a ±0.02	6.02 ^a ±0.03	27.95 ^a ±0.04	2.07 ^a ±0.01	0.46 ^a ±0.02
T8	0.78 ^a ±0.02	6.33 ^a ±0.06	30.58 ^a ±0.02	2.15 ^a ±0.01	0.51 ^a ±0.01
<i>GSH</i>					
T0	0.49 ^a ±0.01	4.93 ^b ±0.03	30.15 ^b ±0.02	2.06 ^a ±0.01	0.71 ^b ±0.03
T2	0.68 ^a ±0.02	6.10 ^b ±0.06	29.25 ^b ±0.05	2.07 ^b ±0.02	0.68 ^b ±0.02
T4	0.72 ^a ±0.02	5.92 ^b ±0.04	29.15 ^b ±0.08	2.11 ^a ±0.01	0.46 ^b ±0.01
T6	0.74 ^a ±0.01	6.35 ^b ±0.01	29.80 ^b ±0.03	2.09 ^b ±0.03	0.54 ^b ±0.03
T8	0.75 ^a ±0.04	6.37 ^b ±0.02	31.05 ^b ±0.10	2.10 ^b ±0.01	0.44 ^b ±0.01

T0: tempo zero; T2: dois meses de envelhecimento; T4: quatro meses de envelhecimento; T6: seis meses de envelhecimento; T8: oito meses de envelhecimento. Todos os valores são médias de triplicatas ± desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna representam diferenças significativas entre amostras adicionadas de glutatona e controle para cada variedade no mesmo tempo de envelhecimento. Tukey ($p < 0.05$).

Em relação aos compostos flavonóides, de forma geral, amostras com adição de glutathione apresentaram valores significativamente maiores de catequina e epicatequina do que as amostras controle durante o tempo de guarda, provavelmente devido às propriedades antioxidantes da glutathione, já que esses compostos são envolvidos nas reações de oxidação que ocorrem em vinhos durante o armazenamento (CLARK, 2008; CLARK et al., 2010). Segundo Du Toit e colaboradores (2006) a oxidação de flavanóis como catequina e epicatequina é acelerada com a presença dos ácidos caftarico e cafeico, compostos encontrados em altas concentrações em vinhos brancos. Estudos realizados por Sonni e colaboradores (2011b) indicam a participação da glutathione na inibição da formação de polímeros formados pela catequina em reação envolvendo acetaldeído e ácido glicóxico, esses compostos também causam o escurecimento de vinhos brancos já que possuem alta absorção em 420 nm. O aumento na concentração de catequina e epicatequina durante o envelhecimento é relacionado com a hidrólise das ligações interflavânicas das proantocianidinas, favorecida nas condições ácidas encontradas nos vinhos. Este aumento nas concentrações de catequina e epicatequina durante o tempo de guarda em garrafa também foi observado por outros autores (ANDRADE et al., 1998; CEJUDO-BASTANTE et al. 2011; FERREIRA-LIMA et al., 2016). O aumento da concentração de *trans*-resveratrol durante o tempo de guarda está principalmente relacionado com a quebra das formas glicosiladas (*piceids*). Durante o armazenamento também foi observado um aumento na concentração de quercetina (Tabela 3), que está relacionado com as reações de hidrólise dos glicosídeos de quercetina que ocorrem durante o envelhecimento (MONAGAS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2006; FANG et al., 2008).

A concentração de tirosol é especialmente dependente da cepa de levedura utilizada durante a fermentação alcoólica e da capacidade de conversão de tirosina em tirosol, porém também depende da composição aminoacídica do mosto (tirosina). Desta forma a concentração de tirosol em vinhos pode apresentar grande variação dependendo da variedade de uva utilizada (PROESTOS et al. 2005). Foi observado um aumento na concentração de tirosol tanto para as amostras adicionadas de glutathione como também para as amostras controle, durante o tempo de guarda. O tirosol pode ser produzido também no vinho a partir de substratos não fenólicos, dessa forma sua concentração pode aumentar durante o envelhecimento (ANDRADE et al., 1998). Suárez et al. (2007) observaram um aumento na concentração de tirosol e hidroxitirosol em

vinhos com 4 anos de armazenamento, estes vinhos apresentaram 175% da concentração de tirosol dos vinhos jovens.

Tabela 4 - Ácidos fenólicos (mgL^{-1}) em vinhos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionados de glutatona (GSH) 10 mgL^{-1} e amostras controle durante 8 meses de tempo de guarda em garrafa.

<i>Sauvignon blanc</i>	Cafeico	Caftarico	Cumárico	Ferúlico	Gálico	Protocateico	Vanílico	Siringico	Elágico
<i>Controle</i>									
T0	1,37 \pm 0,02	5,92 \pm 0,05	1,22 \pm 0,03	0,35 \pm 0,02	3,98 \pm 0,05	0,80 \pm 0,04	1,12 \pm 0,04	0,25 \pm 0,02	0,38 \pm 0,03
T2	1,54 \pm 0,03	7,28 \pm 0,06	3,99 \pm 0,05	1,96 \pm 0,04	3,70 \pm 0,03	0,55 \pm 0,02	1,22 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01
T4	1,45 \pm 0,01	7,43 \pm 0,10	4,29 \pm 0,10	1,75 \pm 0,05	3,37 \pm 0,02	0,47 \pm 0,01	1,29 \pm 0,01	0,29 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01
T6	1,60 \pm 0,03	7,17 \pm 0,09	4,42 \pm 0,03	2,37 \pm 0,07	3,50 \pm 0,01	0,33 \pm 0,02	1,30 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03	0,35 \pm 0,01
T8	1,62 \pm 0,01	7,71 \pm 0,03	4,95 \pm 0,02	2,65 \pm 0,02	3,53 \pm 0,03	0,27 \pm 0,01	1,13 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02
<i>GSH</i>									
T0	1,30 \pm 0,05	5,87 \pm 0,09	1,88 \pm 0,10	0,39 \pm 0,02	2,69 \pm 0,09	0,40 \pm 0,02	1,25 \pm 0,02	0,35 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01
T2	1,69 \pm 0,02	7,78 \pm 0,11	4,15 \pm 0,02	2,39 \pm 0,08	2,08 \pm 0,11	0,34 \pm 0,01	1,35 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
T4	1,58 \pm 0,04	7,84 \pm 0,15	4,80 \pm 0,04	2,43 \pm 0,10	2,19 \pm 0,01	0,55 \pm 0,02	1,21 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02	0,58 \pm 0,02
T6	1,62 \pm 0,02	7,37 \pm 0,05	4,43 \pm 0,05	2,36 \pm 0,02	2,33 \pm 0,04	0,34 \pm 0,02	1,19 \pm 0,04	0,19 \pm 0,01	0,56 \pm 0,01
T8	1,67 \pm 0,01	7,81 \pm 0,02	5,11 \pm 0,01	3,75 \pm 0,04	2,07 \pm 0,10	0,32 \pm 0,01	1,35 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	0,46 \pm 0,02
<i>Manzoni</i>									
<i>Controle</i>									
T0	3,04 \pm 0,02	33,21 \pm 0,04	2,88 \pm 0,01	1,44 \pm 0,01	3,76 \pm 0,02	0,50 \pm 0,01	1,96 \pm 0,01	0,79 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01
T2	3,57 \pm 0,12	39,23 \pm 0,05	6,87 \pm 0,03	0,97 \pm 0,02	3,66 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01	1,99 \pm 0,02	0,57 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02
T4	3,88 \pm 0,06	44,50 \pm 0,01	6,67 \pm 0,05	1,57 \pm 0,01	3,66 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02	2,05 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	1,14 \pm 0,02
T6	4,46 \pm 0,05	40,83 \pm 0,02	6,68 \pm 0,02	1,64 \pm 0,01	3,46 \pm 0,03	0,54 \pm 0,03	2,02 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	1,16 \pm 0,01
T8	4,67 \pm 0,10	44,64 \pm 0,09	7,68 \pm 0,08	2,58 \pm 0,04	3,04 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	2,11 \pm 0,03	0,24 \pm 0,01	1,18 \pm 0,03

Continuação

<i>GSH</i>									
T0	3,45 ^b ±0,05	35,17 ^b ±0,12	3,19 ^b ±0,05	1,94 ^b ±0,03	4,51 ^b ±0,10	0,59 ^b ±0,03	1,85 ^b ±0,02	0,68 ^b ±0,03	0,15 ^b ±0,01
T2	3,62 ^a ±0,08	41,78 ^b ±0,09	7,51 ^b ±0,10	0,98 ^a ±0,02	2,46 ^b ±0,03	0,23 ^b ±0,01	1,90 ^b ±0,03	0,49 ^b ±0,01	0,71 ^a ±0,03
T4	4,04 ^b ±0,03	45,52 ^b ±0,10	8,06 ^b ±0,07	3,80 ^b ±0,05	2,51 ^b ±0,02	0,43 ^b ±0,02	2,23 ^b ±0,08	0,46 ^b ±0,02	1,19 ^b ±0,01
T6	4,60 ^b ±0,02	42,77 ^b ±0,01	7,69 ^b ±0,11	2,95 ^b ±0,01	3,66 ^b ±0,01	0,66 ^b ±0,01	2,05 ^a ±0,03	0,83 ^b ±0,05	0,82 ^b ±0,05
T8	4,80 ^b ±0,01	46,67 ^b ±0,05	7,38 ^b ±0,05	3,39 ^b ±0,07	3,25 ^b ±0,05	0,80 ^b ±0,02	2,12 ^a ±0,02	0,33 ^b ±0,01	1,17 ^a ±0,02
<i>Garganega</i>									
<i>Controle</i>									
T0	2,63 ^a ±0,01	34,05 ^a ±0,03	0,67 ^a ±0,02	0,95 ^a ±0,01	6,75 ^a ±0,02	0,81 ^a ±0,01	1,74 ^a ±0,01	0,63 ^a ±0,01	0,40 ^a ±0,01
T2	2,98 ^a ±0,02	35,79 ^a ±0,18	0,77 ^a ±0,01	1,54 ^a ±0,03	4,37 ^a ±0,03	0,80 ^a ±0,02	1,96 ^a ±0,04	0,50 ^a ±0,02	0,33 ^a ±0,02
T4	3,62 ^a ±0,11	40,99 ^a ±0,05	1,09 ^a ±0,03	2,42 ^a ±0,01	5,38 ^a ±0,10	0,76 ^a ±0,01	2,14 ^a ±0,02	0,34 ^a ±0,01	0,53 ^a ±0,01
T6	3,02 ^a ±0,01	38,11 ^a ±0,13	0,93 ^a ±0,03	1,51 ^a ±0,01	5,37 ^a ±0,03	0,77 ^a ±0,01	2,08 ^a ±0,01	0,30 ^a ±0,02	0,45 ^a ±0,01
T8	3,88 ^a ±0,05	44,01 ^a ±0,04	1,40 ^a ±0,02	2,46 ^a ±0,02	6,24 ^a ±0,06	0,79 ^a ±0,01	2,14 ^a ±0,03	0,26 ^a ±0,02	0,49 ^a ±0,02
<i>GSH</i>									
T0	3,23 ^b ±0,03	36,78 ^b ±0,02	0,86 ^b ±0,04	0,99 ^b ±0,01	6,55 ^b ±0,03	0,79 ^a ±0,02	1,57 ^b ±0,02	0,40 ^b ±0,04	0,54 ^b ±0,02
T2	3,38 ^b ±0,05	39,05 ^b ±0,11	1,50 ^b ±0,01	1,94 ^b ±0,03	4,22 ^b ±0,02	0,81 ^a ±0,01	2,06 ^b ±0,02	0,49 ^a ±0,03	0,83 ^b ±0,05
T4	3,79 ^b ±0,02	41,71 ^b ±0,10	1,54 ^b ±0,05	4,42 ^b ±0,05	4,56 ^b ±0,08	1,01 ^b ±0,03	2,03 ^b ±0,01	0,44 ^b ±0,01	0,75 ^b ±0,04
T6	4,06 ^b ±0,08	38,16 ^a ±0,20	1,90 ^b ±0,07	4,96 ^b ±0,04	4,96 ^b ±0,10	1,19 ^b ±0,03	2,08 ^a ±0,05	0,44 ^b ±0,02	0,85 ^b ±0,01
T8	4,69 ^b ±0,04	45,84 ^b ±0,05	2,04 ^b ±0,10	3,90 ^b ±0,02	5,25 ^b ±0,11	1,00 ^b ±0,02	2,02 ^b ±0,01	0,29 ^a ±0,01	0,83 ^b ±0,01

T0: tempo zero; T2: dois meses de envelhecimento; T4: quatro meses de envelhecimento; T6: seis meses de envelhecimento; T8: oito meses de envelhecimento. Todos os valores são médias de triplicatas ± desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna representam diferenças significativas entre amostras adicionadas de glutatona e controle para cada variedade no mesmo tempo de envelhecimento. Tukey ($p < 0.05$).

A Tabela 4 apresenta as concentrações de ácidos fenólicos em amostras de vinhos adicionadas de glutatona e controle durante 8 meses de tempo de guarda em garrafa. É possível observar o efeito da adição de glutatona sobre a concentração de ácidos hidroxicinâmicos. Segundo outros autores, o principal mecanismo de proteção frente a oxidação exercido pela glutatona é a reação com ácidos hidroxicinâmicos, formando produtos secundários denominados de “adutos” de oxidação, sendo o mais conhecido o *2-S-glutathionyl caffeic acid* ou GRP. Esses produtos formados podem sofrer reações de hidrólise durante o armazenamento, liberando os compostos cinâmicos iniciais (SINGLETON et al., 1985; CHEYNIER et al., 1986; CHEYNIER, RIGAUD E MOUTOUNET, 1990). Estas reações podem justificar a maior concentração de compostos hidroxicinâmicos nos vinhos adicionados de glutatona, pois as amostras controle (sem adição de glutatona) foram mais susceptíveis à oxidação. Patel e colaboradores (2010) também encontraram maiores concentrações de ácidos hidroxicinâmicos em amostras com adição de glutatona. O aumento na concentração de ácidos hidroxicinâmicos livres (cafeico, cumárico e ferúlico) nas amostras adicionadas de glutatona e amostras controle, também está relacionado com a quebra dos respectivos ésteres tartáricos: caftárico, cutárico e fertárico (ALÉN-RUIZ et al. 2009; HERNANZ et al. 2009; ORTEGA et al. 2008). Neste trabalho foi observado um aumento na concentração de ácido caftárico em todas as amostras de vinho, sendo que os vinhos elaborados com a variedade Manzoni apresentaram as maiores concentrações deste composto. Após a depleção da glutatona do meio, a quinona do ácido caftárico pode oxidar o GRP e flavanóis e ser reduzida novamente à ácido caftárico, aumentando dessa forma a concentração desse composto no meio (vinho) (DU TOIT et al., 2006).

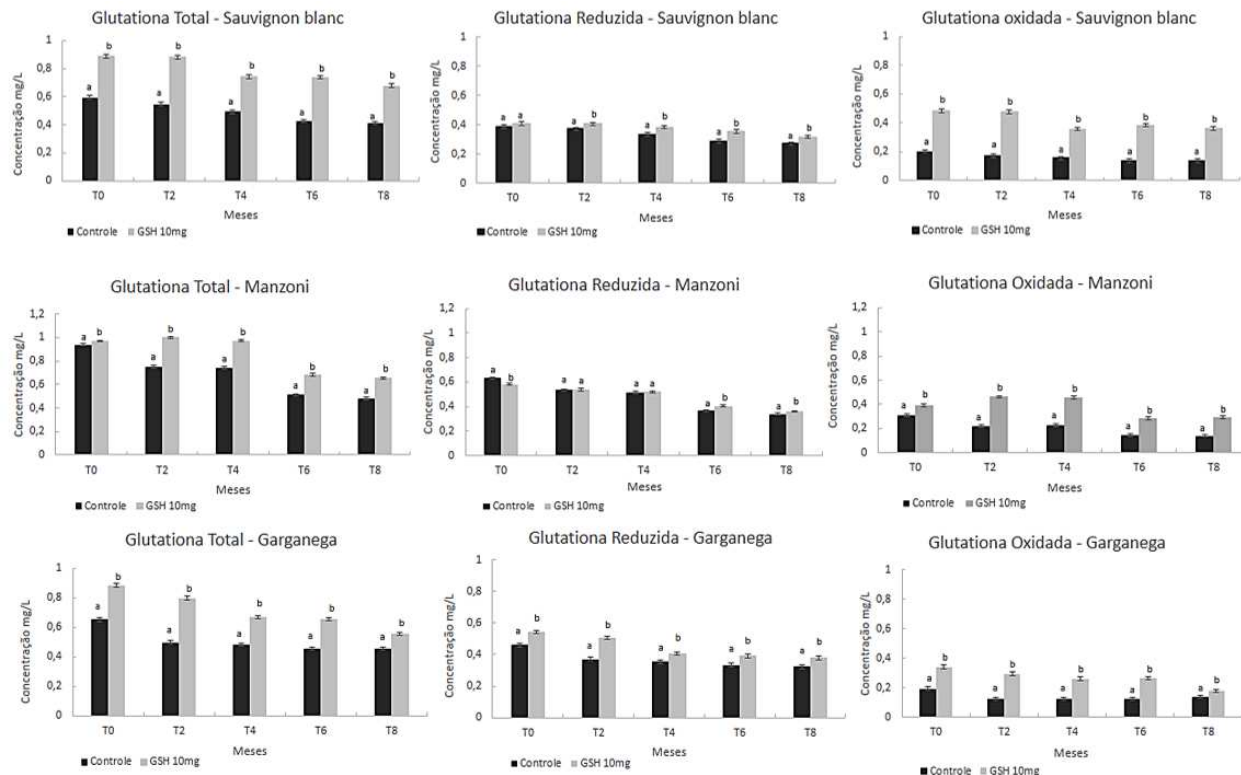
Os ácidos benzoicos apresentaram diferentes comportamentos, em geral uma diminuição na concentração dos ácidos protocateico e siríngico foi observada. Por outro lado, o ácido vanílico apresentou um pequeno aumento na concentração. Os ácidos hidroxibenzóicos podem apresentar diferentes comportamentos durante o envelhecimento dependendo da variedade com a qual o vinho é elaborado. Esses compostos podem participar de diferentes reações como esterificação, condensação e hidrólise, levando a uma variação na sua concentração durante o armazenamento (MONAGAS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005). Como já observado pelos autores (FERREIRA-LIMA et al., 2016) a diminuição do ácido gálico foi acompanhada pelo aumento do ácido elágico. Durante o armazenamento de vinhos pode ocorrer a condensação das moléculas de ácido gálico para formar o ácido elágico, esta é a

principal explicação para a presença de ácido elágico em amostras de vinhos brancos que não passaram por envelhecimento em barril de carvalho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Glutationa total, reduzida e oxidada e Índice de Escurecimento

A concentração de glutatona total, reduzida e oxidada foi determinado por cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência, ao longo dos 8 meses de guarda em garrafa, e os resultados estão apresentados na Figura 1. Como reportado por outros autores (FRACASSETTI et al., 2011; UGLIANO et al., 2011; ANDUJAR-ORTIZ et al., 2012) a concentração de glutatona de vinhos brancos diminuiu com o envelhecimento, e está associada ao consumo deste composto nas reações de oxidação que ocorrem em vinhos durante o armazenamento. A glutatona é capaz de agir rapidamente para proteger os polifenóis do vinho frente à oxidação, através da reação com as quinonas, reduzindo novamente à polifenóis ou originando compostos “adutos” de oxidação (MAKHOTKINA; KILMARTIN, 2009).

Figura 1 - Concentração de glutatona total, reduzida e oxidada (mgL^{-1}) para amostras de vinhos brancos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionadas de glutatona (10 mgL^{-1}) e amostras controle ao longo de 8 meses de guarda em garrafa.



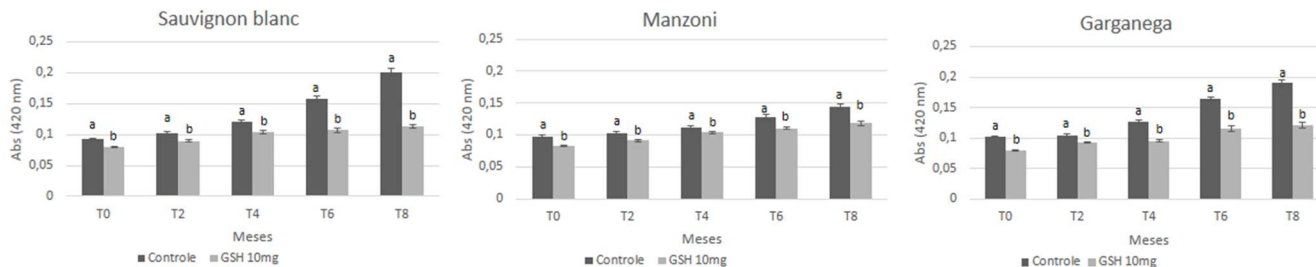
Diferentes letras sobrescritas representam diferenças significativas entre amostras adicionadas de glutatona e controle para cada variedade no mesmo tempo de envelhecimento. Tukey ($p < 0.05$).

De forma geral, verificou-se que durante o tempo de armazenamento as amostras com adição de glutathione apresentaram concentrações de glutathione, especialmente glutathione oxidada (GSSG), significativamente superiores as amostras controle.

O grupamento sulfidril da glutathione é um centro nucleofílico capaz de realizar uma substituição no anel eletrofílico das quinonas formadas e levar à regeneração do anel di-hidroxi, e o produto dessa reação não é substrato para oxidação (SINGLETON et al., 1985). Durante o envelhecimento, parte da glutathione presente em vinhos é oxidada (GSSG) e parte é consumida na reação com ácidos hidroxicinâmicos e catequina (MAKHOTKINA; KILMARTIN, 2009). Como consequência, ocorre uma diminuição na concentração de glutathione total, como observado neste trabalho. Em um estudo realizado por Webber e colaboradores (2014) com espumantes adicionados de glutathione, as concentrações de glutathione encontradas nas amostras de espumante foram menores que as concentrações adicionadas inicialmente no vinho base.

O índice de escurecimento em vinhos brancos foi medido pela absorbância em 420 nm. A Figura 2 apresenta o índice de escurecimento durante 8 meses de guarda em garrafa para os vinhos elaborados com as variedades Sauvignon Blanc, Manzoni e Garganega, com e sem adição de glutathione.

Figura 2 - Índice de escurecimento (Abs 420 nm) para amostras de vinhos brancos Sauvignon blanc, Manzoni e Garganega adicionadas de glutatona (10 mgL^{-1}) e amostras controle ao longo de 8 meses de guarda em garrafa.



Diferentes letras sobrescritas representam diferenças significativas entre amostras adicionadas de glutatona e controle para cada variedade no mesmo tempo de envelhecimento. Tukey ($p < 0,05$).

É possível observar que as amostras adicionadas de glutatona apresentaram menor índice de escurecimento que as amostras controle (Figura 2). Um aumento significativo no índice de escurecimento foi evidenciado a partir do quarto mês de armazenamento, sendo que este aumento é muito maior nas amostras sem adição de glutatona. Em experimento realizado por Sonni e colaboradores (2011) com sistema modelo de vinho, durante 14 dias de oxidação acelerada, soluções controle (sem adição de glutatona) apresentaram escurecimento evidente com 2,5 dias de experimento, enquanto que soluções contendo glutatona não apresentaram coloração no mesmo período de análise. As reações de escurecimento podem ser induzidas pela oxidação enzimática, porém, em vinhos, normalmente a atividade enzimática da PPO é inibida no início do processo pela presença de etanol, desta forma, o escurecimento em vinhos brancos durante o armazenamento está relacionada à oxidação química, que é um processo mais lento do que a oxidação enzimática (DU TOIT et al., 2006).

Dentre as três variedades analisadas, vinhos elaborados com a variedade Manzoni apresentaram menor índice de escurecimento após 8 meses de guarda, essas amostras também apresentaram menor concentração de flavanóis totais (Tabela 2). Existe uma correlação entre a concentração de flavanóis e a sensibilidade ao escurecimento, porém os ácidos hidroxicinâmicos também contribuem para o escurecimento, sendo envolvidos em reações de oxidação acoplada com os flavanóis (DU TOIT et al., 2006).

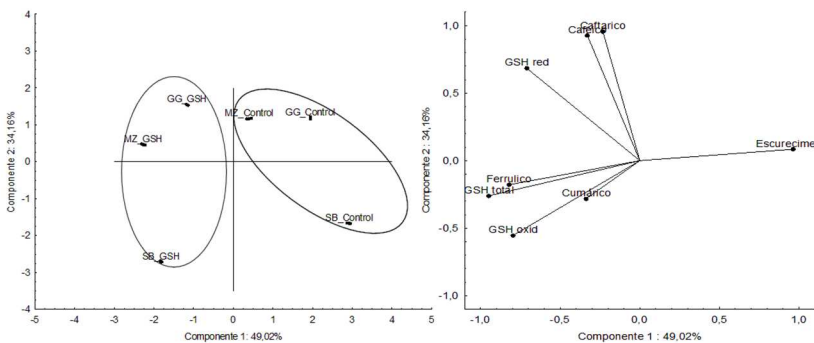
A análise de correlação foi realizada para avaliar a influência da adição de glutatona (10 mgL^{-1}) na composição química, atividade antioxidante e índice de escurecimento de amostras de vinhos brancos analisadas ao fim de 8 meses de guarda em garrafa. A concentração de polifenóis totais apresentou uma alta correlação positiva com a concentração de glutatona reduzida ($R=0,96$) e atividade antioxidante *in vitro* ($R=0,80$). Além da correlação positiva com a concentração de polifenóis totais, a atividade antioxidante foi altamente correlacionada com as concentrações de *o*-difenois ($R= 0,98$), flavanóis totais ($R= 0,85$) e glutatona reduzida ($R=0,71$). Uma importante correlação negativa foi encontrada entre escurecimento e concentração de glutatona total ($R= -0,91$), esse resultado confirma estatisticamente os resultados observados, indicando que a adição de glutatona em concentração de 10 mgL^{-1} contribuiu para um menor índice de escurecimento em vinhos brancos. Além disso, outras correlações positivas importantes foram encontradas entre a concentração de glutatona reduzida e alguns compostos fenólicos

individuais, como catequina ($R=0,75$), epicatequina ($R=0,79$), ácido caftarico ($R=0,79$) e cafeico ($R=0,84$), evidenciando o efeito de proteção exercido pela glutathiona em vinhos já que esses compostos são intimamente envolvidos nas reações de oxidação.

Análise de Componentes Principais

A fim de estabelecer diferenças estatísticas em consequência da adição de glutathiona em vinhos foi também realizada uma análise de componentes principais (ACP). O ACP foi construído utilizando as concentrações de ácidos hidroxicinâmicos, glutathiona e índice de escurecimento, pois são os principais parâmetros afetados pela glutathiona em vinhos brancos.

Figura 3 - Análise de componentes principais (ACP) utilizando as concentrações de ácidos hidroxicinâmicos, glutathiona (total, reduzida e oxidada) e índice de escurecimento de amostras Sauvignon blanc (SB), Manzonni (MZ) e Garganega (GG) com adição de glutathiona (GSH) (10 mgL^{-1}) e amostras controle (Control) com 8 meses de guarda em garrafa (T8).



As duas componentes principais: componente 1 e 2, explicaram 83,18 % das variabilidades dos dados. As amostras com a adição de glutathiona foram claramente separadas das amostras controle pela componente 1 que explicou 49,02 % da variabilidade. Como pode ser observado, amostras sem adição de glutathiona (controle) foram correlacionadas com escurecimento, enquanto que as amostras adicionadas de glutathiona ficaram correlacionadas com compostos hidroxicinâmicos e concentração de glutathiona (total, reduzida e oxidada).

Considerando a componente 2, que explicou 34,16 % da variabilidade, os vinhos elaborados com a variedade Sauvignon Blanc foram separados dos demais vinhos (Manzoni e Garganega) ficando situados no lado negativo desta componente. Essas amostras foram correlacionadas principalmente com maior concentração de glutatona oxidada.

Vinhos da variedade Manzoni e Garganega elaborados com adição de glutatona foram positivamente correlacionados com a concentração de glutatona reduzida e ácidos cafeico e caftarico, principais compostos envolvidos nas reações de oxidação. Segundo Vaimakis e Roussis (1996), vinhos elaborados com adição de glutatona além de preservar suas características varietais não apresentam indícios de processo oxidativo. Ainda segundo esses autores, a adição de glutatona em vinhos brancos podem levar a obtenção de vinhos com coloração estável e características típicas varietais.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou importantes resultados quanto ao efeito da adição de glutatona em vinhos brancos durante o envelhecimento. Os resultados obtidos demonstram que a adição de 10 mgL^{-1} de glutatona reduzida à vinhos brancos antes do engarrafamento exerce um efeito de proteção dos principais compostos fenólicos envolvidos nas reações de oxidação (ácidos hidroxicinâmicos), bem como diminuiu o índice de escurecimento desses vinhos. O efeito protetor da glutatona também foi evidenciado pela maior concentração de polifenóis totais, *o*-difenois e flavanois totais nas amostras com adição deste composto.

Através da análise de componentes principais (ACP) revelou que após oito meses de guarda, as amostras elaboradas com a adição de glutatona foram correlacionada com a concentração de glutatona e ácidos hidroxicinâmicos, enquanto as amostras controle foram correlacionadas com o escurecimento.

A análise e correlação de *Pearson* e ACP foram ferramentas estatísticas úteis para avaliar o efeito da adição de glutatona em vinhos, fornecendo informações importantes as quais podem ser aplicadas para o desenvolvimento de estratégias que visam minimizar as reações oxidação durante a produção de vinhos brancos, contribuindo assim com o setor vitícola do Estado de Santa Catarina na obtenção de produtos de qualidade.

Experimentos futuros como adição de glutatona no mosto antes da etapa de fermentação e a utilização de glutatona associada à outro agente antioxidante como ácido ascórbico por exemplo, são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de proteção da glutatona sobre à oxidação.

5 REFERÊNCIAS

- ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; PÉREZ-LAMELA, M. C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E. & SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, v. 113, p. 53-60, 2009.
- ANDRADE, P.; SEABRA, R.; FERREIRA, M.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of non-coloured phenolics in port wines by capillary zone electrophoresis – Influence of grape variety and ageing. *European Food Research and Technology*, v. 206, p. 161-164, 1998.
- ANDUJAR-ORTIZ, I.; POZO-BAYÓN, M.A.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RODRÍGUEZ-BENCOMO, J.J. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor glutamyl cysteine in wines and model wines supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Analytical Methods*, v. 5, p. 154-161, 2012.
- CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.M.; MOUTOUNET, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 40, p. 320-324, 1989.
- CHEYNIER, V.F.; TROUSDALE, E.K.; SINGLETON, V.L.; MICHEL, J.; SALGUES, R.W. Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 34, p. 217-221, 1986.
- CHEYNIER, V.; VAN HULST, M. W. J. Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionyl caftaric acid in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, p. 10-15, 1988.

CLARK, A. C.; VESTNER, J.; BARRIL, C.; MAURY, C.; PRENZLER, P. D.; SCOLLARY, G. R. The influence of stereochemistry of antioxidants and flavanols on oxidation processes in a model wine system: ascorbic acid, erythorbic acid, (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p.1004-1011, 2010.

CLARK, A. C. The production of yellow pigments from (+)-catechin and dihydroxyfumaric acid in a model wine system. *European Food Research and Technology*, v. 226, p. 925-931, 2008.

DU TOIT, W.J.; MARAIS, J.; PRETORIUS, I.S.; DU TOIT, M. Oxygen in must and wine: A review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, v. 27, p. 76-94, 2006.

FANG F, LI JM, ZHANG P, TANG K, WANG W, PAN QH, HUANG WD. Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Research International*, v. 41, p. 53–60, 2008.

FERREIRA-LIMA, N. E.; BURIN, V. M.; CALIARI, V.; BORDIGNON-LUIZ, T. M. Impact of Pressing Conditions on the Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and Glutathione Content of Brazilian *Vitis vinifera* White Wines and Evolution During Bottle Ageing. *Food Bioprocess and Technology*, p. 1-14, 2016.

FRACASSETTI, D.; LAWRENCE, N.; TREDoux, A.G.J.; TIRELLI, A.; NIEUWOUDT, H.H.; DU TOIT, W.J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*, v. 128, p. 1136-1142, 2011.

HERNANZ, D.; GALLO, V.; RECAMALES, A. F.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*, v. 113, p. 530-537, 2009.

HOSRY, L. E.; AUEZOVA, L.; SAKR, A.; HAJJ-MOUSSA, E. Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 2459-2463, 2009.

International Organisation of Vine and Wine (OIV), Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, Paris 2012, 2012.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitisvinifera* L. during aging in the bottle – Non-anthocyanin phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, v. 220, 331-340, 2005.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Effect of the modifier (Graviano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. I. Anthocyanins, pyranoanthocyanins and non-anthocyanin phenolics. *LWT – Food Science and Technology*, v. 39, p. 1133-1142, 2006.

MAKHOTKINA, O.; KILMARTIN, P.A. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 633, p. 165-174, 2009.

ORTEGA, A. F.; MAYEN, M.; MEDINA, M. Study of colour and phenolic compounds in two models of oxidative ageing for sherry type white wines. *Food Control*, v. 19, p. 949-956, 2008.

PATEL, P.; HERBST-JOHNSTONE, M. LEE, S.A.; GARDNER, R.C.; WEAVER, R.; NICOLAU, L.; KILMARTIN, P.A. Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 7280-7288, 2010.

PENNINCKX, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, v. 2, p. 295-305, 2002.

PROESTOS, C.; BAKOGIANNIS, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A.; KANELLAKI, M.; KOMAITIS, M. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*, v. 16, p. 319-323, 2005. *European Food Research and Technology*, v. 220, p. 331-340, 2005.

ROUSSIS, I. G.; LAMBROPOULOS, I.; TZIMAS, P. Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 58, p. 274-278, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, p. 933-956, 1996.

SONNI, F.; CLARK, A.C.; PRENZLER, P.D.; RIPONI, C.; SCOLLARY, G.R. Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 3940-3949, 2011a.

SONNI, F.; MOORE, E.G.; CLARK, A.C.; CHINNICI, F.; RIPONI, C.; SCOLLARY, G.R. Impact of glutathione on the formation of methylmethine- and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimers in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 7410-7418, 2011b.

SUÁREZ, R.; MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-COROVÉS, C. Phenolic composition and colour of *Vitisvinífera* L. cvMertlot wines from diferente vintages and aging time in bottle. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, v. 22, p. 35-44, 2007.

UGLIANO, M.; KWIATKOWSKI, M.; VIDAL, S.; CAPONE, D.; SIEBERT, T.; DIEVAL, J.B.; AAGAARD, O.; WATERS, E.J. Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 2564-2572, 2011.

VAIMAKIS, V.; ROUSSIS, I.G. Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chemistry*, v. 57, p. 419-422, 1996.

CAPÍTULO 4

**Synthesis, identification and structure elucidation of adducts
formed by reactions of hydroxycinnamic acids with glutathione or
cysteinylglycine**

Nayla Ferreira-Lima, Anna Vallverdú-Queralt, Emmanuelle Meudec,
Jean-Paul Mazauric, Nicolas Sommerer, Marilde T. Bordignon-
Luiz, Véronique Cheynier, Christine Le Guernevé

Artigo aceito na revista *Journal of Natural Products*, 201

CAPÍTULO 5

Oxidação em vinhos brancos: Desenvolvimento e validação de método UPLC-MRM-MS para a quantificação simultânea de adutos, produtos de oxidação, e seus precursores em vinhos

RESUMO

No processamento de vinhos brancos, durante a prensagem das uvas, compostos fenólicos, em especial os ácidos hidroxicinâmicos, são oxidados pela enzima polifenoloxidase (PPO) originando *o*-quinonas que se polimerizam formando pigmentos de coloração escura. Em presença de glutatona, essas *o*-quinonas reagem originando produtos conhecidos como “adutos” de oxidação como o *2-S-glutathionyl caffeic acid* ou GRP (*Grape Reaction Product* – Produto de Reação da Uva). Esses adutos formados não possuem coloração e não servem de substratos para a enzima PPO, evitando assim o escurecimento em vinhos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método de UPLC-MRM-MS sensível, rápido, específico e preciso para quantificar simultaneamente os adutos de oxidação bem como seus precursores, com base nos próprios padrões de compostos (sintetizados quando não comercialmente disponíveis), em vinhos e aplicar este método para avaliar o efeito de diferentes tratamentos de proteção da oxidação em vinhos brancos. Após otimização dos principais parâmetros de UPLC-MRM-MS (gradiente, tempo de corrida cromatográfica, modo de ionização, voltagem capilar, voltagem de cone, energia de colisão entre outros) o método analítico foi validado quanto a linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação e precisão. A linearidade do método foi avaliada utilizando soluções de padrões em 7 níveis de concentração de 0,5 a 100 mgL⁻¹ para GRP, *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid*, *2-S-cysteinylglycyl trans-caffeic acid*, ácidos cafeico, *p*-cumárico e *trans*-caftárico, GSH, GSSG e glucogalina. Após a validação, o método foi aplicado para a análise de vinhos brancos com 4 diferentes tratamentos de proteção da oxidação. Respostas lineares foram obtidas pelo método utilizado até uma concentração de 50 mgL⁻¹ para todos os compostos avaliados, exceto para o ácido *trans*-caftárico e *2-S-cysteinylglycyl caffeic acid* apresentaram respostas lineares até 100 mgL⁻¹. As curvas de calibração ($y=ax+b$) apresentaram-se lineares na gama estudada, com coeficientes de determinação (R^2) ≥ 0.9890 e RSDs ($n = 3$) $\leq 5\%$. As recuperações para os três níveis de concentração avaliados em vinhos variaram de 80 a 110%. Testes de repetibilidade e reprodutibilidade

apresentaram resultados adequados para todos os compostos estudados, com RSDs abaixo de 15%. Os adutos de oxidação apresentaram menores valores de LOQs (0,0104 mgL⁻¹ para GRP; 0,0007 mgL⁻¹ para 2-*S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* e 0,0470 mgL⁻¹ para 2-*S-glutathionyl trans-caffeic acid*) e LODs (0,0033 mgL⁻¹ para GRP; 0,0002 mgL⁻¹ para 2-*S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* e 0,0140 mgL⁻¹ para 2-*S-glutathionyl trans-caffeic acid*), indicando que o método desenvolvido é adequado para a quantificação de produtos da oxidação em vinhos. O presente estudo é o primeiro a investigar e reportar valores de parâmetros de validação para estes compostos, pois não há padrões comerciais disponíveis no mercado. O método validado foi aplicado para análise de vinhos franceses da variedade Chardonnay (*V. vinífera*) elaborados com diferentes tratamentos. O método se mostrou eficiente, sensível, rápido e preciso para a análise de vinhos quanto aos principais produtos de oxidação, bem como seus precursores.

1 INTRODUÇÃO

A oxidação de vinhos brancos é uma das principais preocupações da indústria de vinhos. Este fenômeno resulta no escurecimento e pode afetar características de aroma e *flavor*, diminuindo o tempo de prateleira deste produto. Compostos fenólicos são ótimos substratos para as reações de oxidação, sendo que os principais compostos envolvidos são os ácidos hidroxicinâmicos, os quais são os compostos majoritários em vinhos brancos (SINGLETON et al., 1985; KALLITHRAKA et al., 2009).

Durante o processo de vinificação, mais precisamente na prensagem das uvas, o ácido caftarico é liberado, e na presença de oxigênio este composto é rapidamente oxidado à *o*-quinonas pela enzima polifenol oxidase (PPO) naturalmente presente nas uvas. Essas *o*-quinonas então se polimerizam, formando compostos de coloração escura e causando o escurecimento do vinho (CHEYNIER et al., 1990; CILLIERS; SINGLETON 1989). A glutathione (GSH) é um importante composto em uvas brancas e por consequência nos vinhos brancos, esse tri-peptídeo desempenha um importante papel na prevenção de reações de escurecimento enzimático, capturando as *o*-quinonas dos ácidos hidroxicinâmicos e originando “adutos” de oxidação que limitam o escurecimento, pois esses compostos não são substratos para a PPO. Alguns dos adutos produtos da oxidação de ácidos hidroxicinâmicos já foram descritos na literatura (CHEYNIER et al., 1986, SINGLETON et al., 1985), e sua presença em vinhos pode fornecer importante informação com relação às reações de oxidação e potencial de escurecimento de

vinhos brancos. O primeiro produto a ser totalmente esclarecido foi o 2-*S*-glutathionyl trans-caftaric acid, conhecido como “produto de reação da uva” (*Grape Reaction Product*) ou simplesmente GRP, originado a partir da reação de oxidação entre o ácido caftarico e a glutatona. Além do GRP, o composto 2,5-di-*S*-glutathionyl trans-caftaric acid ou GRP2 também já foi descrito na literatura, esse composto é o produto da oxidação do GRP em presença de um excesso de glutatona no meio (CHEYNIER et al., 1986; CHEYNIER et al., 1990; SALGUES et al., 1986).

A prática mais comum para evitar a oxidação de vinhos brancos é a adição de SO₂ em diferentes etapas do processo de vinificação (desde a prensagem da uva até o engarrafamento do vinho). O SO₂ reage com a forma reduzida do oxigênio, desempenhando um importante papel, reduzindo as quinonas formadas durante o processo de oxidação à sua forma fenol original (PATI et al. 2014). Embora o SO₂ seja muito útil para limitar os danos oxidativos em vinhos brancos e ter efeito antimicrobiano, suas concentrações em vinhos devem ser limitadas em detrimento dos seus efeitos à saúde humana. Tendo isto em vista, métodos alternativos para minimizar o uso deste agente são extensivamente buscados. Há um crescente esforço nas indústrias para evitar ou minimizar a oxidação de vinhos brancos e diversas técnicas estão sendo investigadas, tais como a adição de ácido ascórbico, borra de leveduras, hiperoxidação, adição de glutatona e outras (MATTIVI et al., 2012; POZO-BAYÓN; MONAGAS; BARTOLOMÉ; MORENO-ARRIBAS, 2012, FRACASSETTI et al., 2016).

Como não há padrões comerciais disponíveis, a quantificação do GRP e outros adutos de oxidação é realizada em equivalentes a ácidos caftarico e cafeico (CEJUDO-BASTANTE et al., 2010; MATTIVI et al., 2012; DI LECCE et al., 2013). A combinação da cromatografia líquida e espectrometria de massas para a determinação de compostos fenólicos em vinhos, especialmente os produtos de oxidação e seus precursores, constitui uma importante ferramenta para uma melhor compreensão dos mecanismos de oxidação em vinhos brancos e a extensão do envolvimento da glutatona na prevenção do escurecimento. Dentre as novas tecnologias para a análise de alimentos que têm surgido nos últimos anos, a espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) é a mais importante e mais difundida. Esta técnica provê informações estruturais confiáveis com alta seletividade, permitindo a identificação e quantificação até mesmo de compostos co-eluídos (DI STEFANO et al., 2012). O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de UPLC-MRM-MS sensível, rápido, específico e preciso para quantificar

simultaneamente os adutos produtos de oxidação bem como seus precursores, com base nos próprios padrões de compostos (sintetizados quando não comercialmente disponíveis), em vinhos e aplicar este método para avaliar o efeito de diferentes tratamentos de proteção da oxidação na composição de vinhos brancos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Metanol e ácido fórmico foram fornecidos pela Prolabo (Fontenay sous Bois, France). Ácidos cafeico, caftárico e *p*-cumárico, glucogalina, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foram obtidos na Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). 2-S-glutathionyl *trans*-cafeic acid, 2-S-glutathionyl *trans*-caftaric acid (GRP) and 2-S-cysteinylglycyl *trans*-caftaric acid foram previamente sintetizados (Capítulo 4) em laboratório do Institut National de la Recherche Agronomique - INRA (Montpellier, France). A água utilizada para as análises foi obtida através de sistema de purificação Milli-Q, (Millipore, Massachusetts, USA). Todos os padrões foram preparados em água com 1% (v/v) de ácido fórmico.

2.2 Amostras

Para a validação do método, amostras de vinhos foram fornecidas pela estação experimental do INRA em Pech Rouge (Gruissan, França). Uvas da variedade Chardonnay (*V. vinifera*) foram colhidas em setembro de 2014 no ponto ótimo de maturação, nos vinhedos do INRA em Pech Rouge, França. Após desengaçadas as uvas foram prensadas para obtenção do mosto, em seguida enzimas pectinolíticas foram adicionadas (Rapidase clear, La Litorale, Montpellier, France) (2g hL^{-1}) e foram decantados overnight à 10°C em tanques de aço. Os mostos foram inoculados com leveduras Fermicru LVCB (Oenobrand SAS, Montpellier, France) (20g hL^{-1}) para fermentação alcoólica. Os vinhos obtidos foram engarrafados e as garrafas foram abertas no momento das análises.

Para aplicação do método os vinhos experimentais foram elaborados com uvas da variedade Chardonnay (*V. vinifera*), safra 2014. As uvas foram colhidas no ponto ótimo de maturação, nos vinhedos do INRA em Pech Rouge, França. Os vinhos foram elaborados utilizando 4 diferentes tratamentos visando diminuir a velocidade das reações de

oxidação: PREVOX 01: adição de pellets de CO₂ no momento da colheita e nos tanques de fermentação sob baixa temperatura; PREVOX 02: adição de SO₂ no momento da colheita e na prensa pneumática; PREVOX 03: adição de SO₂ no momento da colheita, baixa temperatura e “neve carbônica” na prensa pneumática e PREVOX 04: adição de ácido ascórbico no momento da colheita, adição de ácido ascórbico e glutatona reduzida (GSH) na prensa pneumática. A colheita das uvas foi mecanizada e para cada tratamento foram utilizados lotes de 500 kg de uva. Após desengaçadas, as uvas separadas em lotes foram prensadas em prensa pneumática com capacidade de 10 hL (Bucher Vaslin SA, Chalonnes sur Loire, France). Nos mostos resultantes de cada experimento foi adicionado enzimas pectinolíticas (Rapidase clear, La Littorale, Montpellier, France) (2g hL⁻¹) e foram decantados overnight à 10°C em tanques de aço. Os mostos foram inoculados com leveduras Fermicru LVCB (Oenobrand SAS, Montpellier, France) (20g hL⁻¹) para fermentação alcoólica. Os vinhos foram engarrafados em garrafas de vidro verde escuro “clássicas” com rolha de cortiça natural. As amostras foram mantidas na posição horizontal sob temperatura controlada (4°C) até o momento das análises.

2.3 Métodos

Validação do método de UPLC-MRM-MS para quantificação de adutos de reações de oxidação e seus precursores

O método foi validado seguindo “Validação de Métodos Bioanalíticos” (Bioanalytical Method Validation - U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration) (2013). Os experimentos de validação foram realizados utilizando o método de adição de padrão em vinhos brancos. Para construção da curva de calibração e linearidade, as amostras de vinho foram contaminadas em 7 níveis de concentração de 0,5 a 100 mgL⁻¹ com os compostos de interesse: GRP, *2-S-glutathionyl trans-cafeic acid*, *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid*, ácidos cafeico, *p*-coumárico e *trans*-caftarico, GSH, GSSG e glucogalina. As amostras de vinhos foram contaminadas em três níveis de concentração: 2, 10 e 50 mgL⁻¹ com os compostos de interesse para avaliação dos parâmetros de limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação e precisão. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada composto, enquanto que o desvio padrão relativo (R.S.D) (Repetibilidade) correspondente foi representativo para precisão *intra-day* (análises de cinco injeções para

cada concentração em um mesmo dia). A precisão *inter-day* (precisão intermediária ou Reprodutibilidade) foi calculada através das análises em triplicata de três dias consecutivos, com cinco replicatas por dia.

As análises de UPLC-MRM-MS foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) Acquity (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), acoplado à um espectrômetro de massas de triplo quadripolo (QqQ) TQD (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) operando em modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM) com ionização electrospray (ESI) nos modos de ionização negativa e positiva. O espectrômetro foi operado em modo íon negativo para a maioria dos compostos com exceção da GSH e GSSG que foram quantificadas em modo íon positivo. O espectro de detecção em arranjo diodos (DAD) foi registrado em uma gama de 210-600 nm (resolução de 1.2 nm). O sistema UPLC incluiu uma bomba binária, um injetor automático com temperatura controlada (7°C) e um detector de arranjo diodos (DAD). O software *MassLynx* foi usado para controlar os instrumentos e adquirir os dados e o software *TargetLynx* foi utilizado para o processamento dos dados. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi uma coluna de fase-reversa Acquity HSS T3 1,8 μm 1,0 \times 100 mm (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) protegida por um filtro *in-line* de 0,2 μm a 40°C. A fase móvel consistiu de água Milli-Q com 1 % (v/v) de ácido fórmico (solvente A) e metanol com 1 % de ácido fórmico (solvente B). A eluição utilizada foi: isocrático por 12 min com 0% B; 12-17 min: 35% B; 17-21 min: 99% B; isocrático por 1 min com 99% B; 22-24 min: 0% B; isocrático por 2 min com 0% B para recondicionamento e equilíbrio da coluna. As temperaturas da fonte e de-solvatação foram 120 °C e 450 °C respectivamente. Nitrogênio foi utilizado como gás de de-solvatação (500 L/h) e cone (50 L/h). Argônio foi utilizado como gás de colisão com um fluxo de 0,16 mL min⁻¹ (VALLVERDU-QUERALT et al., 2015).

As amostras foram filtradas em membrana PTFE de 0,22 μm (Waters) e injetadas na coluna utilizando injetor automático com 1 μL de volume. O fluxo utilizado para as corridas cromatográficas foi 0,17 mLmin⁻¹ e a temperatura do forno foi mantida em 40 °C. Dois detectores foram utilizados: DAD e QqQ. A validação do método foi realizada utilizando o método de adição de padrão. Ácido cutárico foi quantificado em mgL⁻¹ ácido caftárico, cumárico glicosídeo e ferúlico glicosídeo foram quantificados em mgL⁻¹ de glucogalina.

Análise Estatística

Cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *software* Statistica 8.0 (2007) (Statsoft, Inc. Tulsa, OK). *One-way* ANOVA foi realizada, diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey HSD ($p < 0,05$). Análise de Componentes Principais (ACP) foi construída utilizando o mesmo *software*. As amostras de vinhos foram analisadas em triplicata, e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização e validação de método de UPLC-MRM-MS

Neste trabalho um sistema cromatográfico acoplado à um espectrômetro de massas com modo de detecção de monitoramento de múltiplas reações (MRM) foi utilizado para o desenvolvimento de um método que permitiu a quantificação simultânea dos adutos formados durante as reações de oxidação, bem como seus precursores: ácidos hidroxycinâmicos e glutatona em vinhos. As condições cromatográficas e de detecção em modo MRM foram otimizadas através de diversos experimentos.

Para a otimização do método uma fase móvel altamente aquosa foi utilizada sob as condições de fase reversa, devido à natureza polar da glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A coluna selecionada, HSS T3, utiliza uma fase tri-funcional C_{18} ligada a um ligante de densidade intermediária, especialmente desenvolvida para ser usada em fases móveis 100 % aquosas. Além disso, uma fase móvel de caráter ácido foi necessária para melhorar o comportamento cromatográfico dos compostos de interesse. Dessa forma, ácido fórmico foi selecionado, devido sua compatibilidade e volatilidade na fonte de ionização (ESI). As condições cromatográficas otimizadas foram detalhadas na parte experimental deste capítulo. Para todos os compostos de interesse a separação foi alcançada em menos de 26 minutos.

Os parâmetros de MS/MS como modo de ionização, voltagem capilar, voltagem de cone, energia de colisão e tempo de permanência (*dwell time*) foram otimizados para maximizar a sensibilidade, avaliados utilizando as áreas de picos dos compostos. Uma infusão direta dos padrões em água acidificada (1% ácido fórmico) (v/v) foi realizada para verificar a fragmentação e energia de colisão adequada para uma detecção sensível dos compostos de interesse. Foi utilizada uma ionização negativamente carregada $[M - H]^-$ para a detecção dos adutos de

oxidação (GRP, *2-S-glutathionyl caffeic acid* and *2-S-cysteinylglycyl caffeic acid*), ácidos hidroxicinâmicos e glucogalina, e positivamente carregada $[M + H]^+$ para detecção da GSH e GSSG. As condições finais de MS/MS estão detalhadas na Tabela 1, e os espectros dos compostos de interesse estão apresentados no Apêndice (A). Duas transições de MRM foram selecionadas para cada composto, a mais intensa foi utilizada para a quantificação e a outra foi utilizada para identificação/confirmação.

Tabela 1- Parâmetros de UPLC-DAD-MRM-MS otimizados, para os compostos estudados: GRP, *2-S-glutathionyl caffeic acid*, *2-S-cysteinylnl cafftaric acid*, ácidos hidroxicinâmicos, glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e glucogalina.

Compostos	TR ^a (min)	MODO ESI	Transições MRM ^b	Energia de Colisão (V)	Voltagem Cone (V)
GSH	0,98	positivo	308→179 308→162	12	22
GSSG	1,78	positivo	613→177 613→231	34	36
Glucogalina	1,83	negativo	331→169 331→151	18	36
Ácidocis-caftárico	6,67	negativo	311→149 311→179	10	22
Ácido <i>trans</i> -caftárico	8,15	negativo	311→149 311→179	10	22
<i>2-S-cysteinylnl glycylnl cafftaric acid</i>	11,15	negativo	487→355	10	22
Cumárico glicosídeo 1	11,61	negativo	325→163 325→119	20	36
Cutárico	13,79	negativo	295→163 295→149	10	24
GRP	14,61	negativo	616→149 616→167	40	40
Ácido cafeico	14,84	negativo	179→135 179→79	24	26
Ferúlico glicosídeo	15,10	negativo	355→193 355→149	18	36
Cumárico glicosídeo 2	15,66	negativo	325→163 325→119	20	36
<i>2-S-glutathionyl caffeic acid</i>	15,73	negativo	484→167	50	40
Ácido cumárico	16,60	negativo	163→119	14	26

^aTR: tempo de retenção; ^b A primeira linha refere-se à transição de quantificação e a segunda linha à transição de confirmação.

Geralmente, ácidos fenólicos desprotonados produzem uma fragmentação típica, caracterizada pela perda do grupo de ácido carboxílico (-44). Para os ésteres cinâmicos e adutos de oxidação, a principal fragmentação corresponde à perda do ácido tartárico (m/z 149). Para a GSH e GSSG, as principais transições são perdas de 129 u, característico da glutathiona (perda do glutamato) (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015). As identificações foram realizadas comparando os tempos de retenção, espectro UV-visível e MS dos padrões disponíveis. Após a otimização das condições de MS/MS, o método foi então validado.

3.2 Validação do método

Os principais parâmetros de validação avaliados, coeficiente de correlação (r^2), limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), recuperação e precisão *intra* e *inter-day* estão apresentados na Tabela 2.

A linearidade do método foi avaliada utilizando soluções de padrões em 7 níveis de concentração de 0,5 a 100 mgL⁻¹ para GRP, 2-*S-glutathionyl trans-cafeic acid*, 2-*S-cysteinyglycyl trans-caftaric acid*, ácidos cafeico, *p*-coumárico e *trans*-caftárico, GSH, GSSG e glucogalina. Respostas lineares foram obtidas pelo método utilizado até uma concentração de 50 mgL⁻¹ para todos os compostos avaliados, ácido *trans*-caftárico e 2-*S-cysteinyglycyl trans-caftaric acid* apresentaram respostas lineares até 100 mgL⁻¹. As curvas de calibração ($y=ax+b$) apresentaram-se lineares na gama estudada, com coeficientes de determinação (R^2) $\geq 0,9890$ e RSDs ($n = 3$) $\leq 5\%$.

Tabela 2 - Parâmetros de validação do método: Coeficiente de Correlação (r^2), Limites de Detecção e Quantificação (LOD e LOQ), Recuperação, Repetibilidade e Reprodutibilidade em vinho branco.

Compostos	r^2	LOD (mgL ⁻¹)	LOQ (mgL ⁻¹)	Recuperação (%)			Repetibilidade (RSD %)			Reprodutibilidade (RSD %)		
				2 (mgL ⁻¹)	10 (mgL ⁻¹)	50 (mgL ⁻¹)	2 (mgL ⁻¹)	10 (mgL ⁻¹)	50 (mgL ⁻¹)	2 (mgL ⁻¹)	10 (mgL ⁻¹)	50 (mgL ⁻¹)
GSH	0,9998	0,0002	0,0005	103	94	101	3	1	1	4	2	8
GSSG	0,9916	0,0018	0,0059	98	91	102	7	9	1	13	15	4
Glucogalina	0,9999	0,0017	0,0056	96	103	100	7	2	2	9	3	13
Ácido <i>trans</i> -caftárico	0,9976	0,0030	0,0101	105	108	93	1	1	1	12	3	2
<i>2-S-cysteinylglycyl caftaric</i>	0,9989	0,0002	0,0007	89	88	98	3	1	1	8	3	2
GRP	0,9973	0,0031	0,0104	88	80	99	9	3	11	13	11	12
Ácido cafeico	0,9979	0,0011	0,0036	105	110	102	9	2	2	13	9	12
Ácido cumárico	0,9988	0,0033	0,0110	85	101	100	4	15	10	12	14	9
<i>2-S-glutathionyl caffeic acid</i>	0,9890	0,0140	0,0470	95	80	109	4	6	3	4	10	4

Os parâmetros de performance do método para avaliação da exatidão e precisão em um estudo de validação são geralmente a recuperação do composto estudado dentro de uma faixa de 70-120% e a repetibilidade $RSD \leq 20\%$ (SHAH et al., 2000). As recuperações dos analitos foram realizadas avaliando a porcentagem de recuperação de cada composto em vinho. As faixas de concentração foram preparadas de acordo com as concentrações estabelecidas no parâmetro de linearidade. As amostras, contaminadas em três níveis de concentração (2, 10 e 50 mgL^{-1}) com cada composto antes das análises preparadas em triplicata foram analisadas de acordo com as condições ótimas já estabelecidas.

As recuperações para os três níveis de concentração avaliados em vinhos variaram de 80 a 110% (Tabela 2). As precisões *intra* e *inter-day* estudadas apresentaram resultados adequados para todos os compostos estudados, com RSDs abaixo de 15% (Tabela 2). Os valores encontrados neste estudo para recuperação e precisão estão de acordo com os valores preconizados pelo protocolo de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2013).

A sensibilidade do método foi determinada através da avaliação dos parâmetros de limites de detecção (LODs) e limites de quantificação (LOQs). Em relação às duas transições de MRM, a transição de quantificação foi utilizada para propósitos quantitativos, enquanto que a transição de confirmação foi utilizada para análise qualitativa e limites do método. O LOD foi calculado como quantidade de analito capaz de produzir um pico cromatográfico três vezes maior que o ruído da linha de base no cromatograma ($S/N=3$) de uma amostra. O LOQ foi calculado como um sinal dez vezes maior que o ruído da linha de base em um cromatograma ($S/N=10$) (FDA, 2013).

A Tabela 2 apresenta os valores de LODs e LOQs para todos os compostos avaliados. Os valores de LOD e LOQ encontrados neste estudo foram mais baixos que os limites encontrados por outros autores para alguns dos compostos estudados (JANEŠ; LISJAK; VANZO 2010; PORGALI; BÜYÜKTUNCEL 2012). Os adutos de oxidação apresentaram valores de LOQs (0,0104 mgL^{-1} para GRP; 0,0007 mgL^{-1} para 2-*S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* e 0,0470 mgL^{-1} para 2-*S-glutathionyl trans-caffeic acid*) e LODs (0,0033 mgL^{-1} para GRP; 0,0002 mgL^{-1} para 2-*S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* e 0,0140 mgL^{-1} para 2-*S-glutathionyl trans-caffeic acid*) menores que os valores preconizados pelo protocolo de validação de métodos bioanalíticos (FDA, 2013), indicando que o método desenvolvido é adequado para a quantificação de produtos da oxidação em vinhos. Além disso, o presente estudo é o primeiro a investigar e reportar valores de parâmetros de validação para

estes compostos, que não estão disponíveis no mercado como padrões comerciais.

Com relação aos ácidos hidroxicinâmicos, os valores de LODs variaram de 0,0011 a 0,0033 mgL⁻¹ e de LOQs variaram de 0,0036 a 0,0110 mgL⁻¹. Esses valores são mais baixos ou similares aos valores encontrados por outros autores em estudos realizados em uvas e vinhos (ANASTASIADI et al., 2010; SILVA et al., 2011; PORGALI; BÜYÜKTUNCEL 2012). A variação encontrada para os valores de LODs e LOQs para os ácidos hidroxicinâmicos é justificada pela variabilidade das propriedades físico-químicas destes compostos (GRUZ et al., 2008).

Considerando os valores de LODs e LOQs obtidos, o método desenvolvido apresentou-se sensível para a análise de produtos de oxidação e compostos precursores, em apenas 26 minutos de análise foi possível quantificar todos os compostos de interesse. Os valores de RSD (%) confirmaram a precisão do método, que é altamente específico devido à quantificação com base na transição iônica e massa de cada composto.

3.3 Análise de vinhos brancos com diferentes tratamentos

O método validado foi aplicado para análise de vinhos franceses da variedade Chardonnay (*V. vinífera*) elaborados com quatro tratamentos. O método desenvolvido se mostrou eficiente, sensível, rápido e preciso para a análise de compostos originados nas reações de oxidação e seus precursores em vinhos brancos. Em apenas 26 minutos de corrida cromatográfica 13 compostos foram quantificados, as concentrações encontradas para os adutos de oxidação e seus precursores nas amostras analisadas estão apresentadas na Tabela 3. Todas as amostras apresentaram concentrações maiores que os LODs e LOQs para todos os compostos investigados no método.

Tabela 3 - Adutos de reação de oxidação e seus precursores (mgL⁻¹) em vinhos Chardonnay elaborados com diferentes tratamentos.

Compostos	Amostras			
	PREVOX 01	PREVOX 02	PREVOX 03	PREVOX 04
GRP	12,21 ^a ±0,16	6,41 ^b ±0,23	7,82 ^c ±0,320	8,70 ^d ±0,20
<i>2-S-glutathionyl caffeic acid</i>	2,83 ^a ±0,04	2,42 ^b ±0,04	2,55 ^c ±0,04	2,64 ^d ±0,05
<i>2-S-cysteinylglycyl caftaric acid</i>	5,70 ^a ±0,12	2,28 ^b ±0,02	0,49 ^c ±0,02	3,59 ^d ±0,02
GSH	0,37 ^a ±0,004	0,89 ^b ±0,013	0,78 ^c ±0,018	0,77 ^c ±0,005
GSSG	2,18 ^a ±0,005	2,25 ^b ±0,029	2,16 ^a ±0,006	2,23 ^b ±0,004
Ácido <i>trans</i> -caftarico	5,91 ^a ±0,035	7,88 ^b ±0,114	16,69 ^c ±0,138	10,32 ^d ±0,084
Ácido <i>cis</i> -caftarico	2,00 ^a ±0,015	1,58 ^b ±0,014	0,86 ^c ±0,019	0,61 ^d ±0,019
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,99 ^a ±0,001	0,87 ^b ±0,001	2,66 ^c ±0,074	2,01 ^d ±0,001
Ácido cafeico	2,39 ^a ±0,040	2,18 ^b ±0,020	2,60 ^c ±0,125	2,52 ^{ac} ±0,047
Ferúlico glucosídeo	0,50 ^a ±0,009	0,76 ^b ±0,024	0,93 ^c ±0,042	0,92 ^c ±0,130
Ácido cutárico	1,81 ^a ±0,049	3,15 ^b ±0,179	4,79 ^c ±0,496	4,18 ^c ±0,001
Cumárico glucosídeo 1	0,44 ^a ±0,023	0,63 ^b ±0,043	0,94 ^c ±0,053	0,78 ^d ±0,055
Cumárico glucosídeo 2	0,42 ^a ±0,018	0,48 ^{ab} ±0,005	0,70 ^c ±0,052	0,56 ^b ±0,028

GRP: 2-S-glutathionyl caftaric acid; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada. PREVOX 01: pellets de CO₂ na colheita e tanques sob baixa temperatura; PREVOX 02: SO₂ na colheita e prensa pneumática; PREVOX 03: SO₂ na colheita e neve carbônica na prensa pneumática; PREVOX 04: ácido ascórbico na colheita e glutaciona reduzida + ácido ascórbico na prensa pneumática. Todos os resultados são expressos como médias ± desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas em uma mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05) entre as amostras.

Como pode ser observado, as amostras que foram elaboradas com apenas a adição de pellets de CO₂ como proteção da oxidação (PREVOX 01) apresentaram as maiores concentrações de adutos de oxidação: 12,21 mgL⁻¹ para GRP, 2,83 mgL⁻¹ para *2-S-glutathionyl trans-caffeic acide* 5,70 mgL⁻¹ para *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid*. Esta mesma amostra também apresentou os valores mais baixos para glutaciona reduzida (0,37 mgL⁻¹), ácido *trans*-caftarico (5,91 mgL⁻¹) e ácido cutárico (1,81 mgL⁻¹), observa-se que esses compostos são precursores para a formação de adutos durante as reações de oxidação (CHEYNIER et al., 1986; CHEYNIER et al., 1990). Estes resultados indicam que a amostra PREVOX 01 foi a mais afetada pela oxidação.

A amostra PREVOX 02, que foi elaborada com adição de SO₂ no momento da colheita e na prensa, apresentou os menores valores para GRP (6,40 mgL⁻¹) e *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid* (2,42 mgL⁻¹), indicando uma alta proteção frente a oxidação realizada pelo SO₂. A maior eficiência do SO₂ na proteção da oxidação também pode ser observada pela maior concentração de glutatona reduzida nesta amostra. Em estudo realizado por Pati e colaboradores (2014), os autores puderam observar que após 12 meses de armazenamento, vinhos brancos não adicionados de sulfito apresentaram uma composição fenólica diferente dos vinhos que foram adicionados de SO₂, apresentando especialmente derivativos de ácidos hidroxicinâmicos e fenólicos oxidados, indicando que esses vinhos foram mais susceptíveis ao processo de oxidação. Como observado por esses autores, o SO₂ desempenha um papel muito importante na proteção de vinhos brancos contra a oxidação, este agente é capaz de reagir com o oxigênio na forma reduzida, regenerando os fenóis através da redução das quinonas formadas durante o processo de oxidação.

A adição de SO₂ no momento da colheita e a utilização de “neve carbônica” na prensa (PREVOX 03) também se mostrou uma técnica efetiva na proteção da oxidação. Esta amostra apresentou menores concentrações de adutos de oxidação (GRP, *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid*, *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid*) e maiores concentrações de seus precursores: GSH, ácidos caftárico e cafeico quando comparada com as amostras PREVOX 01 e 04. O principal papel antioxidante do SO₂ é reagir com os produtos formados na oxidação de compostos fenólicos e o oxigênio molecular reduzido, principalmente incluindo as *o*-quinonas e peróxido de hidrogênio. Além disso, o SO₂ também pode reagir com o acetaldeído se a reação com o peróxido de hidrogênio não for suficientemente rápida (CLARK et al., 2010).

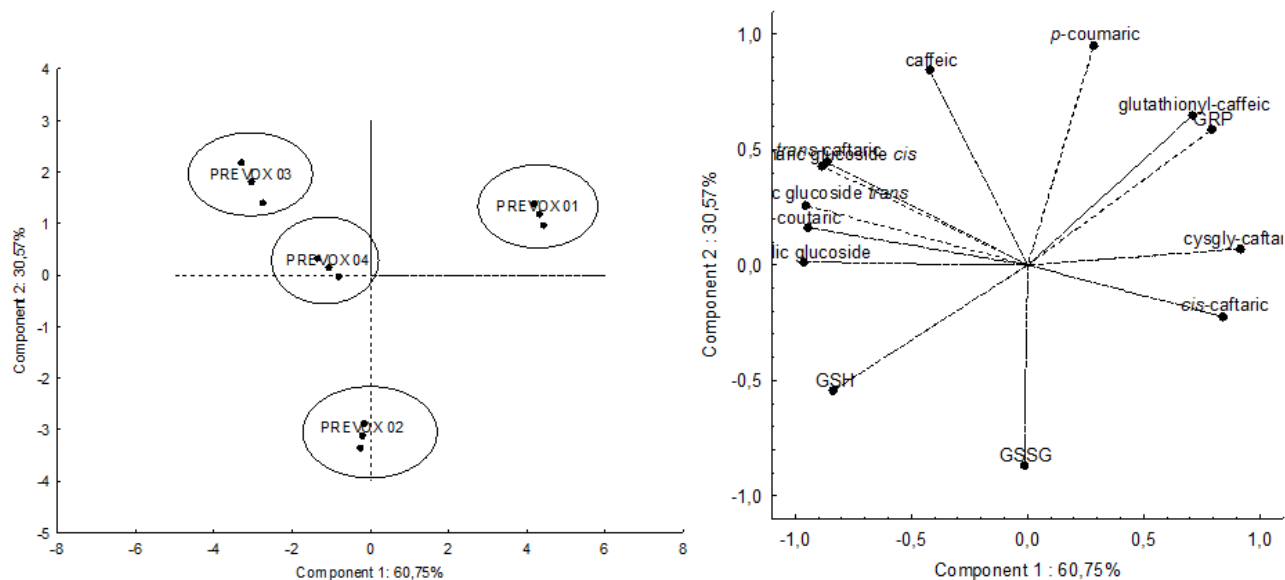
A amostra elaborada com adição de ácido ascórbico e glutatona (PREVOX 04) apresentou maiores concentrações de adutos de oxidação: GRP (8,70 mgL⁻¹); *2-S-glutathionyl trans-caffeic acid* (2,64 mgL⁻¹) e *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* (3,59 mgL⁻¹). Entretanto, essa amostra também apresentou altas concentrações de precursores destes adutos: GSH, ácidos caftárico e cafeico. De acordo com Sonni e colaboradores (2011), a eficiência do ácido ascórbico em evitar a oxidação é alcançada quando utilizado em combinação com SO₂, caso contrário, os produtos de degradação como peróxido de hidrogênio e ácido dehidroascórbico podem levar a formação de pigmentos de deterioração com completa depleção do ácido ascórbico. No mesmo experimento conduzido pelos autores, foi observado que a proteção da

oxidação realizada pela glutathione foi detectada somente quando maiores concentrações deste composto foram adicionadas. No período estudado os autores observaram que a glutathione foi completamente consumida, dando origem à forma oxidada (GSSG), o que pode justificar os valores encontrados neste trabalho para os adutos de oxidação na amostra elaborada com adição de ácido ascórbico e glutathione.

O tratamento de adição de SO_2 no momento da colheita e na prensa pneumática realizado para a amostra PREVOX 02 se mostrou a forma mais efetiva para a proteção de vinhos brancos. A adição de SO_2 diminui a taxa de consumo de oxigênio em mostos e vinhos, inibindo a oxidação enzimática. O SO_2 também reage com o O_2 , e esta reação nos vinhos (baixos valores de pH e presença de etanol) acontece em velocidade menor. O ácido ascórbico quando aplicado tem como produtos o ácido dehidroascórbico e H_2O_2 , que podem atuar como agente pró-oxidante em vinhos. Dessa forma é necessário a utilização de SO_2 em combinação com ácido ascórbico para prevenir a oxidação. (DU TOIT et al., 2006).

A análise de componentes principais (ACP) permite a extração de diferenças entre as amostras e as principais variáveis. O ACP foi aplicado neste estudo para extrair informação útil da complexa matriz de compostos encontrados nos vinhos Chardonnay elaborados com diferentes tratamentos de proteção da oxidação. Esta análise estatística pode indicar uma tendência que pode ser relevante para visualizar o efeito das diferentes proteções de oxidação sobre a composição química dos vinhos.

Figura 1 - Análise de Componentes Principais (ACP) para vinhos Chardonnay elaborados com diferentes tratamentos.



Quando um gráfico bidimensional foi construído (Figura 1), as duas componentes principais contaram com mais de 90% da variância. Foi possível observar que as amostras foram agrupadas de acordo com o tratamento de proteção aplicado. Com relação a CP1, a qual explicou 60,75% da variabilidade, a amostra PREVOX 01 foi claramente separada das demais amostras e correlacionada com os adutos de oxidação. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos nas análises de UPLC-MRM-MS, os quais indicaram que esta amostra foi a mais susceptível à oxidação. Além disso, considerando a CP2 (30,57% da variabilidade) a amostra PREVOX 02 foi separada das demais amostras e correlacionada com alguns dos precursores dos adutos de oxidação.

4 CONCLUSÃO

Um método de UPLC-MRM-MS rápido, sensível e preciso foi desenvolvido e validado para análise de adutos de oxidação originados nas reações de oxidação entre ácidos hidroxicinâmicos e glutathiona ou o peptídeo cisteinil-glicina. O método desenvolvido apresentou valores de parâmetros de validação como linearidade, LOD, LOQ, precisão e recuperação de acordo com os valores preconizados em ensaios de validação. O método se mostrou linear até uma concentração de 50 mgL^{-1} para todos os compostos, sendo que os compostos ácido *trans*-caftárico e *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acid* mostraram-se lineares até concentração de 100 mgL^{-1} . Considerando os valores de LOQs e LODs obtidos o método mostrou-se sensível, além disso, como a quantificação foi realizada com base na transição de íon e na massa de cada composto investigado, o método se apresenta específico e preciso para a análise de produtos da oxidação e precursores em vinhos. Em 26 minutos de corrida cromatográfica foi possível quantificar os adutos de oxidação e também seus precursores, indicando que este método pode ser utilizado em análises de rotina em laboratório para investigação de processos oxidativos em vinhos.

O método validado se apresentou eficiente para a quantificação dos principais compostos envolvidos nas reações de oxidação em vinhos brancos. Dentre as amostras analisadas, vinhos tratados com pellets de CO_2 na fase pré-fermentativa foram os que apresentaram maiores concentrações de adutos de oxidação, enquanto que as amostras tratadas com SO_2 no momento da colheita e na prensagem apresentaram os menores valores destes compostos.

Este trabalho foi o primeiro a investigar e reportar valores de parâmetros de validação para os adutos de oxidação: GRP, *2-S-cysteinylglycyl trans-caftaric acide 2-S-glutathionyl trans-caffeic acid*.

5 REFERÊNCIAS

ALBERTS, P. Applications of liquid chromatography – tandem mass spectrometry to wine analysis: targeted analysis and compound identification. Doctorate these, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa, 2012.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-colored polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, v. 43, p. 805-813, 2010.

CEJUDO-BASTANTE, M.J.; PEREZ-COELLO, M.S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Identification of new derivatives of 2-S-glutathionylcaftaric acid in aged white wines by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 11483-11492, 2010.

CLARK, A. C., VESTNER, J., BARRIL, C., MAURY, C., PRENZLER, P. D., SCOLLARY, G. R. The Influence of Stereochemistry of Antioxidants and Flavanols on Oxidation Processes in a Model Wine System: Ascorbic Acid, Erythorbic Acid, (+)-Catechin and (-)-Epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 1004-1011, 2010.

DI LECCE, G.; BOSELLI, E.; D'IGNAZI, G.; FREGA, N. G. Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions. *LWT – Food Science and Technology*, v. 53, p. 54-60, 2013.

DI STEFANO, V.; AVELLONE, G.; BONGIORNO, D.; CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SFORZA, S.; DOSSENA, A.; DRAHOS, L.; VEKEY, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *Journal of chromatography A*, v. 1259, p. 74-85, 2012.

Food and Drug Administration - FDA. 2013. USD of H and HSF and DAS. Bioanalytical Method Validation. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>. Acessado em janeiro de 2016.

FRACASSETTI, D.; GABRIELLI, M.; COSTA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; TIRELLI, A. Characterization and suitability of polyphenols-based formulas to replace sulfur dioxide for storage of sparkling white wine. *Food Control*, v. 60, p. 606-614, 2016.

KALLITHRAKA, S.; SALACHA, M.; TZOUROU, I. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, v. 113, p. 500-505, 2009.

MATTIVI, F.; FEDRIZZI, B.; ZENATO, A.; TIEFENTHALER, P.; TEMPESTA, S.; PERENZONI, D.; CANTARELLA, P.; SIMEONI, F.; VRHOVSEK, U. Development of reliable analytical tools for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. *Analytica Chimica Acta*, v. 732, p. 194-202, 2012.

PATI, S.; CRUPI, P.; BENUCCI, I.; ANTONACCI, D.; DI LUCCIA, A.; ESTI, M. HPLC-DAD-MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Research International*, v. 66, p. 207-215, 2014.

PORGALI, E.; BÜYÜKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*, v. 45, p. 145-154, 2012.

POZO-BAYÓN, M. A.; MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 52, p. 31-57, 2012.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL, M. L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; YACOBI, A. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 1551-1557, 2000.

SILVA, C. L.; PEREIRA, J.; WOUTER, V. G.; GIRÓ, C.; CÂMARA, J. S. A fast method using a new hydrophilic-lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. *Talanta*, v. 86, p. 82-90, 2011.

SONNI, F.; CLARK, A. C.; PRENZLER, P. D.; RIPONI, C.; SCOLLARY, G. R. White Wine Antioxidant Action of Glutathione and the Ascorbic Acid/Glutathione Pair in a Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 3940-3949, 2011.

VALLVERDÚ-QUERALT, A.; VERBAERE, A.; MEUDEC, E.; CHEYNIER, V.; SOMMERER, N. Straightforward method to quantify GSH, GSSG, GRP, and Hydroxycinnamic acids in wines by UPLC-MRM-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 142-149, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de uma pressão de 0,5 a 1,0 bar na etapa de prensagem do mosto mostrou-se uma boa alternativa a ser adotada pela indústria durante o processo de vinificação de vinhos brancos, alcançando maior extração de compostos biotativos. Vinhos elaborados a partir de mostos prensados apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos e glutatona, além disso esses vinhos também apresentaram maior atividade antioxidante *in vitro*.

A adição de glutatona reduzida aos vinhos brancos exerceu um efeito protetor sobre os principais compostos envolvidos nas reações de oxidação de vinhos brancos, como ácidos hidroxicinâmicos e glutatona. Vinhos brancos com adição de glutatona apresentaram maiores concentrações destes compostos e menores índices de escurecimento.

Neste trabalho, adutos formados nas reações de oxidação entre a glutatona ou peptídeo cisteinil-glicina e ácidos cafeico ou caftarico foram elucidados e identificados pela primeira vez. Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a substituição do grupamento tiol da glutatona ou da cisteinil-glicina não ocorre exclusivamente na posição 2 do anel aromático, como postulado por diversos autores, mas também pode ocorrer nas posições 5 e 6. Além disso, resultados encontrados para a fragmentação desses adutos nas análises de espectrometria de massas revelam características particulares de acordo com o derivativo formado e a posição de substituição no anel aromático.

Um método de UPLC-MRM-MS foi desenvolvido e validado para a quantificação dos adutos de oxidação e seus precursores em vinhos. O tempo de corrida cromatográfica foi de 26 minutos. O método apresentou excelentes valores para os principais parâmetros de oxidação, indicando sua aplicação nas análises de rotina em laboratórios para investigar processos oxidativos em vinhos.

APÊNDICE A - Cromatogramas de UPLC-MRM-MS para os compostos validados: adutos de oxidação, ácidos hidroxicinâmicos, glutatona e glutatona oxidada em amostra de vinho branco.

